



Université de Montréal

# **Rôle des Protéoglycanes à Héparane Sulfate dans le Transfert de Gène des Cellules CHO et HEK293**

par Laurence Delafosse

Département de Biochimie et de Médecine Moléculaire

Faculté de Médecine

Thèse présentée  
en vue de l'obtention du grade de docteur  
en biochimie

Mai, 2016

© Laurence Delafosse, 2016

## Résumé

La possibilité de programmer une cellule dans le but de produire une protéine d'intérêt est apparue au début des années 1970 avec l'essor du génie génétique. Environ dix années plus tard, l'insuline issue de la plateforme de production microbienne *Escherichia coli*, fut la première protéine recombinante (r-protéine) humaine commercialisée. Les défis associés à la production de r-protéines plus complexes et glycosylées ont amené l'industrie biopharmaceutique à développer des systèmes d'expression en cellules de mammifères. Ces derniers permettent d'obtenir des protéines humaines correctement repliées et de ce fait, biologiquement actives. Afin de transférer le gène d'intérêt dans les cellules de mammifères, le polyéthylèneimine (PEI) est certainement un des vecteurs synthétiques le plus utilisé en raison de son efficacité, mais aussi sa simplicité d'élaboration, son faible coût et sa stabilité en solution qui facilite son utilisation. Il est donc largement employé dans le contexte de la production de r-protéines à grande échelle et fait l'objet d'intenses recherches dans le domaine de la thérapie génique non virale. Le PEI est capable de condenser efficacement l'ADN plasmidique (vecteur d'expression contenant le gène d'intérêt) pour former des complexes de petites tailles appelés polyplexes. Ces derniers doivent contourner plusieurs étapes limitantes afin de délivrer le gène d'intérêt au noyau de la cellule hôte. Dans les conditions optimales du transfert de gène par le PEI, les polyplexes arborent une charge positive nette interagissant de manière électrostatique avec les protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG) qui décorent la surface cellulaire. On observe deux familles d'HSPG exprimés en abondance à la surface des cellules de mammifères : les syndécanes (4 membres, SDC1-4) et les glypicanes (6 membres, GPC1-6). Si l'implication des HSPG dans l'attachement cellulaire des polyplexes est aujourd'hui largement acceptée, leur rôle individuel vis-à-vis de cet attachement et des étapes subséquentes du transfert de gène reste à confirmer.

Après avoir optimisées les conditions de transfection des cellules de mammifères CHO et HEK293 dans le but de produire des r-protéines sécrétées, nous avons entrepris des cinétiques de capture, d'internalisation des polyplexes et aussi d'expression du transgène afin de mieux comprendre le processus de transfert de gène. Nous avons pu observer des différences au niveau de ces paramètres de transfection dépendamment du système d'expression et des

caractéristiques structurelles du PEI utilisé. Ces résultats présentés sous forme d'articles scientifiques constituent une base solide de l'enchaînement dans le temps des événements essentiels à une transfection efficace des cellules CHO et HEK293 par le PEI.

Chaque type cellulaire possède un profil d'expression des HSPG qui lui est propre, ces derniers étant plus ou moins permissifs au transfert de gène. En effet, une étude menée dans notre laboratoire montre que les SDC1 et SDC2 ont des rôles opposés vis-à-vis du transfert de gène. Alors que tous deux sont capables de lier les polyplexes, l'expression de SDC1 permet leur internalisation contrairement à l'expression de SDC2 qui l'inhibe. De plus, lorsque le SDC1 est exprimé à la surface des cellules HEK293, l'efficacité de transfection est augmentée de douze pourcents. En utilisant la capacité de SDC1 à induire l'internalisation des polyplexes, nous avons étudié le trafic intracellulaire des complexes SDC1 / polyplexes dans les cellules HEK293. De plus, nos observations suggèrent une nouvelle voie par laquelle les polyplexes pourraient atteindre efficacement le noyau cellulaire.

Dans le contexte du transfert de gène, les HSPG sont essentiellement étudiés dans leur globalité. S'il est vrai que le rôle des syndécanes dans ce contexte est le sujet de quelques études, celui des glypicanes est inexploré. Grâce à une série de traitements chimiques et enzymatiques visant une approche « perte de fonction », l'importance de la sulfatation comme modification post-traductionnelle, l'effet des chaînes d'héparanes sulfates mais aussi des glypicanes sur l'attachement, l'internalisation des polyplexes, et l'expression du transgène ont été étudiés dans les cellules CHO et HEK293.

L'ensemble de nos observations indique clairement que le rôle des HSPG dans le transfert de gène devrait être investigué individuellement plutôt que collectivement. En effet, le rôle spécifique de chaque membre des HSPG sur la capture des polyplexes et leur permissivité à l'expression génique demeure encore inconnu. En exprimant de manière transitoire chaque membre des syndécanes et glypicanes à la surface des cellules CHO, nous avons déterminé leur effet inhibiteur ou activateur sur la capture des polyplexes sans pouvoir conclure quant à l'effet de cette surexpression sur l'efficacité de transfection. Par contre, lorsqu'ils sont présents dans le milieu de culture, le domaine extracellulaire des HSPG réduit l'efficacité de transfection des cellules CHO sans induire la dissociation des polyplexes. Curieusement, lorsque chaque HSPG

est exprimé de manière stable dans les cellules CHO, seulement une légère modulation de l'expression du transgène a pu être observée.

Ces travaux ont contribué à la compréhension des mécanismes d'action du vecteur polycationique polyéthylèneimine et à préciser le rôle des protéoglycanes à héparane sulfate dans le transfert de gène des cellules CHO et HEK293.

**Mots-clés :** polyéthylèneimine, transfection, protéine recombinante, CHO, HEK293, protéoglycane à héparane sulfate, syndécane, glypicane

## Abstract

With the aim to express a protein of interest, the transfer of exogenous genetic material into host cells was established in early 70s with the development of genetic engineering. Approximately ten years later, insulin was the first human recombinant protein (r-protein) produced at large scale in *Escherichia coli* and commercialized. Challenges associated with the production of more complex and glycosylated r-proteins brought the pharmaceutical industry to develop mammalian expression platforms. Thus, the expressed r-proteins are correctly folded and biologically active. As a means to transfer genetic materials of interest into mammalian cells, the synthetic vector polyethylenimine (PEI) is probably the most popular due to its efficacy, ease of use, cost-effectiveness and stability in solution. Consequently, PEI is largely employed for the production of r-proteins by large scale and extensively studied in the context of non-viral gene therapy. PEI is capable to efficiently condense plasmid DNA (expression vector containing the gene of interest) to form small nanoparticles termed polyplexes. The latter must circumvent several steps to deliver the gene of interest to the cell nucleus. When formed at the optimum conditions, polyplexes exhibit a net positive charge which can interact electrostatically with negatively charged heparan sulfate proteoglycans (HSPG) located at the cell surface. There are two major families of HSPG that are largely expressed at the surface of mammalian cells: the syndecans (4 members, SDC1-4) and the glypicans (6 members, GPC1-6). Although it is generally accepted that HSPG are involved in the binding of polyplexes, their individual role toward polyplex binding and the subsequent phases of gene transfer need to be confirmed.

Following optimization of the mammalian CHO and HEK293 cells transfection conditions, we undertook an in-depth study of polyplexes uptake, internalization kinetics, as well as transgene expression kinetics with the aim to better understand the mechanisms underlying gene transfer. We observed several contrasting differences between the two cell lines and the type of PEI used. Our results presented as a scientific article, establish strong basis of the gene transfer process over-time.

Every cell type possesses its own expression profile of HSPG which can display individual potency toward gene transfer. Indeed, a preliminary study conducted in our laboratory showed

that SDC1 and SDC2 have distinct features with regard to gene transfer. While both are capable to bind polyplexes at the cell surface, the expression of SDC1 enhances polyplexes internalization whereas the expression of SDC2 drastically inhibits it. Furthermore, when SDC1 is expressed at the surface of HEK293 cells, the transfection efficiency is increased by twelve percent compared to control cells. By using the ability of SDC1 to mediate efficient internalization of polyplexes, we have studied the intracellular traffic of SDC1 / polyplexes complexes. Our conclusions lead to new insights concerning the path by which polyplexes can mediate efficient transfection.

In the context of gene transfer, HSPG have been essentially studied in their entirety. Although the role of syndecans is the subject of some studies, that of glypicans is unexplored. Thanks to a series of chemical and enzymatic treatments leading to « loss of functions », the importance of sulfation as post-translational modification, the effect of HS chains and of glypicans on the attachment, internalization of polyplexes as well as transgene expression were investigated in CHO and HEK293 cells.

Taken together, our observations indicate clearly that the role of HSPG should be investigated individually instead of collectively. Consequently, the individual potency of each HSPG member regarding gene transfer remains to be defined. We demonstrated that, in fact, the transient expression of some HSPG in CHO cells have a beneficial effect on polyplexes uptake while others have a negative effect. Unfortunately, this method did not allow concluding about their effect on transfection efficacy. However, when present in the culture medium, the extracellular domain of HSPG decreases transfection efficacy of CHO cells without inducing polyplexes dissociation. Strangely, when each HSPG is stably expressed in CHO cells, only subtle modulations of the gene expression level were observed.

This study contributed to a better understanding of the mechanisms underlying PEI mediated gene transfer in CHO and HEK293 cells and clarify the role of HSPG in gene transfer.

**Keywords:** polyethylenimine, transfection, recombinant protein, CHO, HEK293, heparan sulfate proteoglycan, syndecan, glypican

# Table des Matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iv
Table des Matières .....	vi
Liste des Tableaux .....	xiv
Liste des Figures .....	xv
Liste des Sigles et Abréviations.....	xix
Remerciements.....	xxiv
Avant-Propos .....	xxvi
La Tête dans les Nuages ... ..	xxvi
La Production d’Anticorps Thérapeutiques .....	xxvi
Introduction.....	1
Contexte Historique et Biotechnologique.....	1
Objectifs de la Thèse.....	4
Contributions de Chacun des Auteurs aux Articles .....	4
Article 1 : Comparative study of polyethylenimines for transient gene expression in mammalian HEK293 and CHO cells.....	4
Article 2 : Intracellular trafficking of polyethylenimine/syndecan-1 complexes in HEK293 cells .....	5
Article 3 : Role of Sulfated Glycosaminoglycans and Glypicans in polyethylenimine-mediated gene transfer of CHO and HEK293 cells .....	5
Chapitre 1 : Revue de Littérature.....	6
La Production de Protéines Recombinantes .....	6
Les Systèmes d’Expression.....	7
Les Systèmes d’Expression Procaryotes.....	7
Les Systèmes d’Expression Eucaryotes.....	8
Les Levures.....	8
Les Cellules d’Insectes .....	9



Les Plantes Transgéniques .....	9
Les Cellules de Mammifères .....	10
Choix du Système d'Expression .....	12
Généralités .....	12
Expression Stable ou Expression Transitoire .....	13
Système d'Expression Choisi dans le Contexte de cette Thèse .....	14
Les Techniques de Transfert de Gène .....	15
Généralités sur les Vecteurs .....	15
Les Vecteurs de Nature Lipidique .....	16
Les Lipides Monocationiques .....	18
Les Lipides Polycationiques .....	19
Les Vecteurs de Nature Polymérique .....	20
La Polylysine .....	20
Les Dendrimères .....	22
Le Chitosan .....	23
Le Polyéthylèneimine .....	24
Synthèse et Structure du Polyéthylèneimine .....	24
Les Modifications Chimiques du Polyéthylèneimine .....	26
Caractéristiques Physico-Chimiques des Polyplexes .....	27
Le Polyéthylèneimine à l'État Libre .....	28
La Cytotoxicité du Polyéthylèneimine .....	29
Conclusion .....	30
Les Obstacles du Transfert de Gène .....	31
L'Entrée dans la Cellule .....	32
Les Voies d'Endocytose .....	32
L'Endocytose des Polyplexes .....	34
La sortie des Endosomes .....	36
Le Trafic Intracytoplasmique et l'Entrée dans le Noyau .....	37
La Dissociation des Polyplexes .....	38
Les Protéoglycanes à Héparane Sulfate .....	38
Généralités .....	38

Structure des Chaînes Polysaccharidiques d'Héparane Sulfate.....	39
Biosynthèse des Chaînes Polysaccharidiques d'Héparane Sulfate.....	41
Les Principaux Protéoglycanes à Héparane Sulfate : Glypicanes et Syndécanes.....	44
Généralités .....	44
Les glypicanes.....	44
Les syndécanes.....	45
Fonctions des Protéoglycanes à Héparane Sulfate.....	47
Généralités .....	47
Glypicanes et Cancer .....	48
Les syndécanes.....	49
Les Protéoglycanes à Héparane Sulfate et le Transfert de Gène .....	51
L'Attachement des Nanoparticules à la Membrane Cellulaire .....	51
L'Endocytose des Polyplexes .....	52
La Dissociation des Polyplexes .....	55
Conclusion de la revue de littérature .....	55
Chapitre 2 : Comprendre le Transfert de Gène par le Polyéthylèneimine dans les Cellules de Mammifères CHO et HEK293.....	57
Comparative Study of Polyethylenimines for Transient Gene Expression in Mammalian HEK293 and CHO Cells.....	58
Abstract.....	58
Introduction.....	59
Materials and Methods.....	60
Materials .....	60
Transfection .....	61
Secreted Alkaline Phosphatase Activity Measurement .....	62
Antibodies Production .....	62
Quantification of N-propionyl Residues .....	62
Flow Cytometry Analysis .....	63
Results.....	64
Optimization of DNA:PEI Ratios for HEK293 and CHO Cells Transfection.....	64

Cytotoxicity of PEIs-based Polyplexes.....	65
Acylation Level of Polyethylenimines.....	67
Attachment and Endocytosis Kinetics of Polyplexes .....	68
Blue Fluorescent Protein Expression .....	70
Antibody Productions .....	72
Discussion .....	74
Conclusion .....	77
Supplemental Data .....	78
Data in Brief: Physicochemical Properties of LPEI 25 kDa, PEI“Max” 40 kDa and PEIpro™ .....	81
Abstract .....	81
Value of the Data .....	81
Data .....	81
Experimental Design, Materials and Methods.....	84
Size Exclusion Chromatography.....	84
Plasmid DNA Affinity .....	85
Chapitre 3 : Le Cheminement Intracellulaire des Polyplexes liés au Syndécan 1 .....	86
Intracellular Trafficking of Polyethylenimine/Syndecan-1 Complexes in HEK293 Cells...	86
Abstract .....	86
Introduction.....	87
Materials and Methods.....	89
Reagents .....	89
Vector Construction .....	89
Labeling of PEI and Plasmid DNA.....	89
Cell Culture and Transfection .....	90
Flow Cytometry Analyses.....	92
Colocalization Experiments and Confocal Microscopy .....	92
Transmission Electron Microscopy .....	93
Online Supplemental Material .....	93
Results.....	93

Polyplexes Induce Clustering and Endocytosis of SDC1 .....	93
Polyplex/SDC1 Complexes are Endocytosed via Lipid Rafts and Clathrin-dependent Pathway.....	96
Polyplex/SDC1 Endosomes are Weakly Addressed to Lysosomes but Mainly to the Trans-Golgi Network.....	100
SDC1 is not Recycled via Rab 11 but Degraded. ....	102
Polyplexes are Released into the Cytoplasm and Form Large Aggregates .....	104
Discussion.....	105
Chapitre 4 : Importance des Glypicanes dans le Transfert de Gène .....	111
Role of Sulfated Glycosaminoglycans and Glypicans in Polyethylenimine-Mediated Gene Transfer of CHO and HEK293 Cells .....	112
Abstract.....	112
Introduction.....	113
Materials and Methods.....	115
Materials .....	115
Cell Maintenance .....	115
Cell Treatments.....	116
Chemical Treatment.....	116
Enzymatic Treatments .....	116
Cell Surface Immunofluorescence.....	117
Transfection .....	118
Polyplex Uptake Analysis.....	119
Transgene Expression .....	119
Results.....	119
Sodium Chlorate Treatment Reduces HS Sulfation.....	119
Role of Sulfation in Polyethylenimine-Mediated Gene Delivery in CHO and HEK293 Cells .....	123
Are Heparan Sulfate Proteoglycans the Main Contributor for Polyethylenimine-based Polyplex Uptake in CHO and HEK293 cells? .....	125

Role of Glypicans in Polyethylenimine-mediated Gene Delivery in CHO and HEK293 Cells .....	127
Discussion .....	130
Conclusion .....	133
Supplemental Data .....	134
Chapitre 5 : Rôle Spécifique des Protéoglycanes à Héparane Sulfate dans le Transfert de Gène des Cellules CHO.....	139
Introduction et Hypothèse de Travail .....	139
Objectif et Approches Expérimentales .....	140
Méthodes Expérimentales.....	140
Maintenance Cellulaire .....	140
Clonage Moléculaire des Constructions Plasmidiques.....	141
Généralités .....	141
Digestion Enzymatique des Plasmides .....	143
Amplification par Réaction en Chaîne de la Polymérase (PCR) .....	143
Digestion Enzymatique des Produits de PCR.....	144
Ligation .....	144
Transformation Bactérienne.....	144
Criblage des Clones .....	145
Amplification des Plasmides.....	145
Quantification et Pureté des Plasmides.....	145
Transfection des Cellules.....	146
Expression Transitoire des Protéoglycanes à Héparane Sulfate dans les Cellules CHO-3E7 .....	146
Transfection des Cellules CHO-3E7 par le Polyéthylèneimine Linéaire .....	147
Cytométrie en Flux .....	147
Microscopie à Fluorescence.....	149
Purification des Domaines Extracellulaires des Protéoglycanes à Héparane Sulfate.....	150
Électrophorèse sur Gel de Polyacrylamide en Présence de Dodécylsulfate de Sodium (SDS-PAGE).....	151

Western Blot .....	152
Quantification de l'ADN Double Brin par le PicoGreen®.....	152
Obtention de « Pools » Cellulaires Stables .....	153
Système Inductible au Cumate.....	153
La Lignée Cellulaire CHO <sup>BRI</sup> -55E1 .....	153
Transfection .....	154
Système de Sélection GS / MSX .....	155
Résultats .....	157
Niveau d'Expression des Protéoglycanes à Héparane Sulfate.....	157
Effet de l'Expression Transitoire des Protéoglycanes à Héparane Sulfate sur la Capture des Polyplexes .....	159
Effet de l'Expression Transitoire des Protéoglycanes à Héparane Sulfate sur l'Expression du Transgène .....	161
La Présence des Domaines Extracellulaires dans le Milieu de Culture Réduit l'Efficacité du Transfert de Gène.....	163
Dissociation des Polyplexes.....	167
Expression Stable des Protéoglycanes à Héparane Sulfate.....	170
Effet de l'Expression Stable des Protéoglycanes à Héparane Sulfate sur la Capture de Polyplexes et l'Efficacité du Transfert de Gène .....	175
Étude génomique des cellules CHO <sup>BRI</sup> .....	178
Discussion - Conclusion .....	180
Chapitre 6 : Conclusion Générale .....	185
Généralités .....	185
Le Transfert de Gène dans les Cellules de Mammifères CHO et HEK293 .....	186
Rôle des Protéoglycanes a Héparane Sulfate dans le Transfert de Gene des Cellules CHO et HEK293 .....	187
Syndécanes et Glypicanes.....	189
Le syndécan-1 et le Cheminement Intracellulaire des Polyplexes.....	190
Les Glypicanes et le Transfert de Gène des Cellules CHO et HEK293 .....	191

Le Rôle Individuel des Protéoglycanes à Héparane Sulfate dans le Transfert de Gène des Cellules CHO .....	193
Perspectives Générales.....	195
Mot de la fin .....	196
Bibliographie.....	i
Annexe 1 : Prix et Bourses Obtenus durant la Thèse.....	i
Annexe 2 : Les Méthodes Physiques du Transfert de Gène .....	ii
Annexe 3 : Les Vecteurs Viraux et le Transfert de Gène .....	iv
Annexe 4 : Liste des Ligands Extracellulaires du SDC1 .....	v
Annexe 5 : Listes des Constructions Plasmidiques.....	vi
Annexe 6 : Induction de l'Expression Transitoire des Protéoglycanes à Héparane Sulfate .....	vii
Annexe 7 : Effet de l'Expression Stable des HSPG sur la Capture des Polyplexes par les Cellules CHO <sup>BRI</sup> -55E1.....	viii
Annexe 8 : Effet de l'Expression Stable des HSPG sur l'Expression du Transgène dans les Cellules CHO <sup>BRI</sup> -55E1.....	ix

## Liste des Tableaux

Tableau 1 : Vectors used in this study. ....	61
Tableau 2 : Optimal DNA:PEI ratios leading to the most efficient SEAP expression. ....	64
Tableau 3 : Hydrodynamic diameter (nm) and zeta potential (mV) of polyplexes. ....	78
Tableau 4 : List of antibodies used in this study.....	117
Tableau 5 : List of pDNA:PEI ratios used to transfect HEK293 and CHO cells and physicochemical characteristics of the corresponding polyplexes. ....	118
Tableau 6 : Analyse des données du génome et du transcriptome des cellules CHO-K1 et CHO <sup>BRI</sup> .....	180



# Liste des Figures

Figure 1 : Repères historiques du développement des biotechnologies. ....	3
Figure 2 : Champs d'application de la production de protéines recombinantes. ....	6
Figure 3 : Comparaison des différents systèmes d'expression. ....	13
Figure 4 : Répartition des systèmes d'expression utilisés pour la production industrielle de produits biologiques.....	14
Figure 5 : Les différentes composantes d'un plasmide classique ou vecteur d'expression.....	16
Figure 6 : Structures du colipide DOPE et des lipides monocationiques DOTMA et DOTAP. .....	18
Figure 7 : Structures des lipides polycationiques DOGS et DOSPA.....	20
Figure 8 : Structure chimique le la poly-L-lysine.....	21
Figure 9 : Structure chimique du dendrimère polyamidoamine (PANAM). ....	23
Figure 10 : Structure chimique du chitosan. ....	24
Figure 11 : Structures chimiques de l'aziridine, 2-éthyl-2-oxazoline, polyéthylènimine branché et linéaire.....	25
Figure 12 : Déacylation du polyéthylènimine linéaire.....	27
Figure 13 : Représentation schématique des étapes du transfert de gène par le polyéthylènimine et paramètres à considérer.....	31
Figure 14 : Classification des voies d'endocytose et leurs inhibiteurs les plus couramment utilisés. ....	32
Figure 15 : Mécanisme schématisé du phénomène d'éponge à protons.....	36
Figure 16 : Publications mentionnant les héparanes sulfates par année depuis 1974.....	39
Figure 17 : Structure et conformation des héparanes sulfates. ....	40
Figure 18 : Biosynthèse des héparanes sulfates.....	43
Figure 19 : Représentation schématique des glypicanes.....	44
Figure 20 : Représentation schématique des syndécanes. ....	46
Figure 21 : Diversité fonctionnelle des protéoglycanes à héparane sulfate.....	47
Figure 22 : Mécanismes d'action des glypicanes. ....	49
Figure 23 : Représentation schématique du syndécane-1, structure, fonctions et ligands.....	51
Figure 24 : Les deux phases endocytotiques d'un complexe SDC1 / ligand multivalent. ....	54

Figure 25 : Résumé graphique de l'article « Comparative study of polyethylenimines for transient gene expression in mammalian HEK293 and CHO cells ».	57
Figure 26 : PEIs-mediated transfection of HEK293 and CHO cells, propidium iodide labeling and viability determination.	66
Figure 27 : 1D <sup>1</sup> H-NMR spectra of partially acylated LPEI and fully deacylated PEI“Max” and PEIpro <sup>TM</sup> .	68
Figure 29 : Antibody expression following transfection with PEIs.	73
Figure 30 : Total cell density and viability of cultures producing monoclonal antibodies following transfection with PEIs.	80
Figure 31 : Size Exclusion Chromatography of LPEI 25kDa, PEI“Max” 40kDa and PEIpro <sup>TM</sup> .	82
Figure 32 : DNA condensation ability of polyethylenimines.	83
Figure 33 : Optimization of BPEI / pDNA (w/w) ratio.	91
Figure 34 : Polyplexes addition induces the formation of SDC1 clusters.	94
Figure 35 : Polyplexes-SDC1 complexes progress after endocytosis.	95
Figure 36 : Polyplex/SDC1 complexes are endocytosed via lipid rafts.	97
Figure 37 : Colocalization of polyplex/SDC1 complexes with cholera toxin B.	98
Figure 38 : Implication of clathrin-coated pits in polyplex/SDC1 complexes endocytosis.	99
Figure 39 : Polyplex/SDC1 endosomes partly colocalize with lysosomes.	100
Figure 40 : Polyplex/SDC1 endosomes mainly colocalize with the trans-Golgi network.	101
Figure 42 : Polyplexes are released into the cell cytoplasm and form aggregates.	104
Figure 43 : Macropinocytosis of polyplexes.	107
Figure 44 : Proposed model for the endocytosis and intracellular trafficking of polyplex/SDC1 complexes.	109
Figure 45 : Résumé graphique de l'étude concernant l'implication des glypicanes dans le transfert de gène.	112
Figure 47 : Effect of sodium chlorate on cell growth, viability and morphology.	121
Figure 46 : Effect of sodium chlorate treatment on HS sulfation.	122
Figure 48 : Effect of undersulfation on polyplex uptake and transgene expression.	124
Figure 49 : Polyplex uptake and transgene expression following heparinase III treatment.	126

Figure 50 : Heparan sulfate in LPEI- and BPEI-mediated transfection of CHO and HEK293 cells. ....	127
Figure 51 : Polyplex uptake and transgene expression after glypicans removal. ....	128
Figure 52 : SEAP protein yield in PIPLC-treated CHO and HEK293 cells. ....	129
Figure 53 : Optimization of PEI-mediated transfection of CHO and HEK293 cells. ....	134
Figure 54 AB : Uptake kinetics of PEI-based polyplexes and blue fluorescent protein expression in CHO. ....	135
Figure 54 CD : Uptake kinetics of PEI-based polyplexes and blue fluorescent protein expression in HEK293 cells. ....	136
Figure 55 : Efficacy of PIPLC treatment. ....	137
Figure 56 : Heparinase III treatment. ....	138
Figure 57 : Mécanisme de la commutation par la tétracycline ....	142
Figure 58 : Détermination du ratio répresseur / ADN d'intérêt pour l'expression transitoire de chaque HSPG. ....	146
Figure 59 : Principe de la cytométrie en flux. ....	149
Figure 60 : Représentation schématique des étapes de la purification des ectodomaines. ....	151
Figure 61 : Représentation schématique du commutateur cumate. ....	154
Figure 62 : Transfection initiale des cellules CHO <sup>BRI</sup> -55E1. ....	155
Figure 63 : Phase de sélection des « pools » cellulaires exprimant de manière stable chaque protéoglycane à héparane sulfate. ....	156
Figure 64 : Expression transitoire de chaque protéoglycane à héparane sulfate. ....	158
Figure 65 : Regroupement de SDC-2 à la surface des cellules CHO-3E7 et HEK293. ....	159
Figure 66 : Effet de l'expression transitoire des HSPG sur l'internalisation des polyplexes. ....	160
Figure 67 : La transfection par le FS-MAX prévient une transfection subséquente par le LPEI. ....	162
Figure 68 : Production des ectodomaines des protéoglycanes à héparane sulfate. ....	164
Figure 69 : Domaines extracellulaires des HSPG et internalisation des polyplexes. ....	166
Figure 70 : Domaines extracellulaires des HSPG et efficacité du transfert de gène. ....	167
Figure 71 : Dissociation des polyplexes et évaluation de la quantité d'ADNp libérée. ....	169
Figure 72 : Intégrité des polyplexes en présence des ectodomaines. ....	169

Figure 73 : Cinétique d'attachement et d'internalisation des polyplexes, et expression du transgène dans les cellules CHO <sup>BRI</sup> -55E1.....	171
Figure 74 : Effet de l'induction au cumate sur l'expression des HSPG-mRFP1.....	173
Figure 75 : Croissance et de viabilité des cellules suite à l'induction de l'expression des protéoglycanes à héparane sulfate. ....	174
Figure 76 : Effet de l'expression stable des protéoglycanes à héparane sulfate sur la capture des polyplexes par les cellules CHO <sup>BRI</sup> -55E1.....	176
Figure 77 : Effet de l'expression stable des protéoglycanes à héparane sulfate sur l'expression du transgène dans les cellules CHO <sup>BRI</sup> -55E1.....	177
Figure 78 : Immunomarquage des différents « pools » cellulaires par l'anticorps anti-HS (clone 10E4).....	178

## Liste des Sigles et Abréviations

Ab : anticorps

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNp : ADN plasmidique

AP-2 : complexes adaptateur 2

ARF : ADP-ribosylation factor

ARN : acide ribonucléique

BFP : protéine fluorescente bleue

BMP : protéines de la morphogenèse osseuse

BPEI : polyéthylènimine branché

CASK : sérine protein kinase calcium / calmodulin dépendante

CHO : cellule d'ovaire d'hamster chinois

CMV : cytomégalovirus

CNRC : conseil national de recherche du Canada

COS-7 : cellules rénales de singe vert africain (*Cercopithecus aethiops*)

CS : chondroïtine sulfate

CTxB : sous-unité B de la toxine cholérique

D : dimension

DLS : diffusion dynamique de la lumière

DOGS : dioctadecylamine-glycine-spermine

DOPE : dioléoyl-phosphatidyléthanolamine

DOTAP : méthylsulfate de N-[1-(2,3 dioléoyloxy) propyl] N,N,N triméthylammonium

DOTMA : chlorure de N-[1-(2,3-dioléoyloxy) propyl]-N,N,N-triméthylammonium

DS : dermatane sulfate

DTT : dithiothréitol

E. coli : Escherichia coli

EBNA1 : antigène nucléaire 1 du virus Epstein Barr

EMA : european medicines agency

EPO : erythropoïétine

ERK : Kinase régulée par des signaux extracellulaires

FACS : tri de cellules activées par fluorescence  
 FDA : Food and Drug Administration  
 FGF : facteur de croissance des fibroblastes  
 FLOT : flotilline  
 GAG : glycosaminoglycane  
 GFP : protéine fluorescente verte  
 GPC : glypicane  
 GPI : glycosyl phosphatidyl inositol  
 GS : glutamine synthétase  
 HEK : cellule d'embryon de rein humain  
 HeLa : cellule Henrietta Lacks  
 Hep III : héparinase III  
 HGF : facteur de croissance des hépatocytes  
 Hhg : Hedgehog  
 HP : héparine  
 HPLC : chromatographie en phase liquide à haute performance  
 hpt : heure post-transfection  
 HRP : peroxydase du raifort  
 HS : héparane sulfate  
 HUH-7 : lignées cellulaires d'hépatocarcinome  
 IFM : intensité de fluorescence moyenne  
 IMAC : chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés  
 K : potassium  
 kDa : Kilo Dalton  
 KS : kératane sulfate  
 L : litre  
 LDL : lipoprotéine de basse densité  
 LE : endosome tardif  
 LPEI : polyéthylènimine linéaire  
 mAb : anticorps monoclonal  
 min : minute

mL : millilitre  
 MPT : modification post-traductionnelle  
 mRFP1 : protéine monomérique fluorescente rouge  
 MSX : L-méthionine sulfoximine  
 M $\beta$ CD : méthyl- $\beta$ -cyclodextrine  
 N / P : azote / phosphate  
 NDST : N-déacétylase/N-sulfotransférase  
 OST : O-sulfotransférase  
 PAGE : électrophorèse sur gel de polyacrylamide  
 PANAM : polyamidoamine  
 Pal-1 : inhibiteur 1 des activateurs du plasminogène  
 PAPS : 3'-Phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase  
 PBS : tampon phosphate salin  
 PCR : réaction en chaîne de la polymérase  
 PDL : poly-D-lysine  
 PDZ-BM : motif de liaison PDZ  
 PEG : polyéthylène glycol  
 PEI : polyéthylènimine  
 PIPLC : phosphatidylinositol phospholipase C  
 PG : protéoglycane  
 PKC : protéine kinase C  
 pKa : constante de dissociation acide  
 PLL : poly-L-lysine  
 RE : réticulum endoplasmique  
 RITC : Rhodamine B isothiocyanate  
 RMN : résonance magnétique nucléaire  
 r-protéine : protéine recombinante  
 RT : température ambiante  
 rt-PA : activateur du plasminogène tissulaire recombinant  
 SDC : syndécane  
 SDS : dodécylsulfate de sodium

SEAP : phosphatase alcaline secrétée  
SEC : chromatographie d'exclusion par la taille  
SPR : résonance plasmonique de surface  
SULF : sulfotransférase  
TetO : opéron tétracycline  
TetR : répresseur de l'opéron tétracycline  
TGE : expression transitoire du gène  
TGN : réseau trans golgien  
TSH : thérapeutiques en santé humaine  
V : volt  
v-WF : facteur von Willebrand  
Wnt : *Wingless-related integration*  
 $\mu$ L : microlitre



*« The gap between theory and experiment is a great stimulus to the imagination »*

**Francis Crick**

A Yann et Louise,

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Yves Durocher, mon directeur de thèse, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. Il est à l'origine de ce travail de thèse et je désire lui témoigner ma reconnaissance pour la confiance qu'il m'a accordée. Les travaux présentés ne sont qu'une petite partie de tout ce qu'il a accompli dans le domaine du transfert de gène et la production de protéines recombinantes. Je souhaite sincèrement que cette thèse soit à la hauteur de ses attentes en lui témoignant ainsi mon profond respect et ma gratitude pour son temps, son écoute et ses encouragements.

Je remercie ensuite les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail. J'espère leur avoir offert une lecture agréable en gage de ma gratitude.

J'adresse également mes remerciements à toutes les personnes du département de biochimie et médecine moléculaire de l'Université de Montréal que j'ai pu côtoyer de près ou de loin durant mon cursus. Je pense tout d'abord à Sylvie Beauchemin et Linda D'Astous qui m'ont rendu la vie plus facile en m'aidant dans mes démarches administratives. Je remercie aussi les professeurs Alain Moreau et Julio Fernandes qui ont accepté de faire partie de mon comité de thèse. Je suis sortie grandit de chacune de nos rencontres.

Je souhaite remercier la faculté des études supérieures et la faculté de médecine de l'Université de Montréal pour m'avoir octroyé plusieurs bourses durant mon cursus (Annexe 1).

Je tiens à remercier Sylvie Perret, Roseanne Tom, Gilles St-Laurent et Denis L'Abbé pour leur accueil chaleureux à mon arrivée au CNRC et leurs explications concernant les rouages de la culture cellulaire, du transfert de gène et du clonage. Merci d'avoir partagé tant de moments privilégiés. Sylvie a été une colocataire de bureau formidable ; son dynamisme et sa constante bonne humeur ont été d'un grand soutien. C'est aussi une maman extraordinaire qui m'inspire chaque jour depuis que je suis devenue moi-même maman. Je remercie sincèrement un grand nombre de personne que j'ai rencontré au CNRC, avec qui j'ai eu des discussions plus ou moins sérieuses (!) et qui ont chacun joué un rôle clé durant ces dernières années : Antoine Caron, Alaka Mullick, Alain Pelletier, Alina Burlacu, Anne-Marie Boyer, Anne Marcil, Amine Kamen, Alain Alary, Christian Gervais, Cassio Baptista, Christine Gadouri, Éric Grazzini, Emma Petiot, Felix Malenfant, Felix Carbonell, Florence Do, Feng Ni, François Vaillancourt, Hélène

L'Écuyer-Coelho, Johny Montes, Julien Leroy, Karine Brault, Louis Bisson, Louise Pilote, Linda Lamoureux, Lucie Bourget, Luis Ortega, Martin Loignon, Mélanie Duchesne, Marie-Josée Massariol, Nancy Rémillard, Nancy MacDonald, Ping Xu, Ricardo Ochoa, Sven Ansorge, Simon Lord-Dufour, Simon Joubert, Sylvain Armando, Vincent Dodelet, Yuliya Martynova...

Je remercie tous les étudiants et doctorants qui ont arpenté les corridors du CNRC et qui ont croisé mon chemin. Je garde de très bons souvenirs de nos discussions, journal club, randonnées, campings, canot-camping, marches aux flambeaux et bien d'autres activités plaisantes : Adeline Poulain, Alexandre Lennaerzt, Benjamin Wolter, Charles Fortier, Céline Raymond, Cécile Toussaint, Christine Thompson, Elodie Louvier, Florian Cambay, July Dorion-Thibaudeau, Marc-André Robert et Samantha Noël. Sans vous cette thèse n'aurait pas eu la même saveur.

Je remercie tout particulièrement mes sincères amis de l'autre côté de l'Atlantique qui ont cru en moi et ont été patients : Sonia et David Bugarza, Audrey Minier et William, ainsi que leurs formidables enfants, Marc Chapuis et Sébastien Gachet. De ce côté de l'Atlantique, je remercie Sarah et Max Delcour, Geoffroy Serrano, Elaine Sansoucy et leurs enfants avec qui je découvre chaque jour l'art d'être parent.

Enfin, je tiens à remercier chaleureusement toute ma famille et belle-famille qui m'ont soutenu à leur manière, discrète, et d'avoir compris mon isolement de ces derniers mois. Mes parents Sophie et Jean-Patrice, ma chère sœur Laetitia, mon beau-frère Gaëtan, ma nièce Shirine et mes trois neveux adorés Marley, Harlem et Giovanni, mes tantes et oncles, mes nombreux cousins et cousines... J'ai aussi une pensée pour mon arrière-grand-mère Inès Pucci qui a été l'ange de ma vie et qui m'a appris ce qu'était la générosité. Un immense merci à Yann et Louise que j'aime et qui me procure tant de joie au quotidien. Si l'un d'entre vous s'intéresse un jour à la science et décide de lire cette thèse, l'avant-propos qui suit vous est dédié en espérant vous immerger en douceur.

## **Avant-Propos**

### **La Tête dans les Nuages ...**

J'aime la science ! Tout d'abord c'est à cause de mon père, adepte de parapente, qui revenait à la maison avec des histoires extraordinaires et des livres décrivant les nuages. La formation des nuages, leur aspect, leur altitude étaient donc expliqués par des phénomènes scientifiques, plus précisément atmosphériques. Tout était clair, je serais météorologue dans la vraie vie ! Cette ambition m'a porté jusqu'à l'étude des mathématiques et de la physique qui se sont avérées être trop théoriques à mon goût. J'ai donc trouvé un réconfort dans l'étude de la biochimie qui m'a permis de m'épanouir au niveau personnel. Les biochimistes analysent, expérimentent, se trompent et parfois trouvent ... Aujourd'hui, je suis sur le point de finir ma thèse de doctorat et j'ai encore bien plus de questions qu'à son commencement. Il y a en fait tellement de questions à élucider qu'elles pourront occuper de nombreuses générations futures. Dans le but de susciter de nouvelles vocations et de partager ma passion pour la science, je vous propose de découvrir mon texte décrivant la production d'anticorps thérapeutiques soumis dans le cadre du concours de vulgarisation de la Famille Bergeron (2016).

### **La Production d'Anticorps Thérapeutiques**

Les anticorps sont de petites molécules produites par notre organisme pour le protéger lorsqu'il est attaqué par un pathogène tel qu'une bactérie ou un virus. Ainsi, pour chaque pathogène qui réussit à infecter notre organisme correspond un anticorps. Dans le but de soigner une personne, il est possible de lui administrer des anticorps qui ont été produits en laboratoire. Le système de production est biologique et fait intervenir trois acteurs principaux : une cellule hôte capable d'exprimer l'anticorps, un gène porteur d'un message sous forme de code (le code génétique) indiquant à la cellule quel anticorps elle doit produire, et enfin un vecteur permettant d'aider le gène à atteindre le noyau cellulaire où le contenu du message est déchiffré. Le gène protégé par son vecteur que l'on nommera Poly (polyéthylèneimine), vont ensemble entreprendre un voyage semé d'obstacles pour atteindre le noyau de la cellule qui va ensuite produire l'anticorps.

Il était une fois Poly, une toute petite molécule qui devait livrer un message secret jusqu'au noyau de la cellule ... De manière hésitante Poly se dirige vers la cellule qui est tout de même deux cents fois plus grande qu'elle, et découvre une membrane composée de lipides et de protéines qui se déplacent le long de celle-ci et forment une barrière qui ressemble étrangement à une mosaïque. Tout en s'approchant de cette membrane, Poly aperçoit de longues chaînes de sucre nommées héparanes sulfates qui décorent la surface de la cellule et l'attirent irrésistiblement au point qu'elle s'attache à l'une d'entre elles. En quelques secondes, les héparanes sulfates se regroupent et encerclent Poly qui est surprise de voir la membrane s'enfoncer comme aspirée vers l'intérieur de la cellule. Poly se retrouve rapidement dans la cellule mais elle est prisonnière d'une petite partie de la membrane qui s'est refermée suite à son passage et qui s'appelle endosome. A bord de son endosome, Poly se déplace facilement dans le cytoplasme visqueux qui compose l'intérieur de la cellule et peut ainsi admirer le spectacle incroyable qu'offrent les habitants de cette dernière. En route vers le noyau, c'est du moins ce qu'espère Poly, elle croise des tubulines qui s'organisent en réseau ressemblant à un cylindre (microtubule) et des filaments d'actine. De loin il semble que ces longs câbles composés d'actines et de tubulines soutiennent la membrane de part et d'autre comme un squelette mobile qui définirait la forme de la cellule. L'atmosphère se réchauffe au voisinage des mitochondries qui sont de petits organites ressemblant curieusement à des bactéries. Ce sont les centrales énergétiques de la cellule qui produisent une quantité importante d'énergie indispensable à la vie. Poly rencontre aussi les ribosomes qui ressemblent à de gros champignons composés de trois cents mille atomes et travaillent ensemble pour produire toutes les protéines nécessaires à la cellule. Certains sont libres tandis que la majorité sont attachés à une grosse structure aplatie proche du noyau de la cellule, le réticulum endoplasmique. C'est ici que la plupart des protéines sont produites et continuent leur chemin dans l'appareil de Golgi formé d'un empilement de croissants. Les protéines qui traversent l'appareil de Golgi en sortent recouvertes de sucres, correctement repliées et prêtes à remplir leurs fonctions biologiques. Poly est toute étourdie par cette parade d'organites et de molécules. Fascinée par le décor qui l'entoure, elle ne réalise pas tout de suite que l'environnement de son endosome change et devient de plus en plus acide. C'est la faute aux protons (!) qui ne cessent de s'infiltrer dans l'endosome grâce à de petites pompes qui tapissent sa membrane. Poly essaie alors de capturer le plus de protons possibles comme si elle était une éponge, mais au bout de quelques minutes

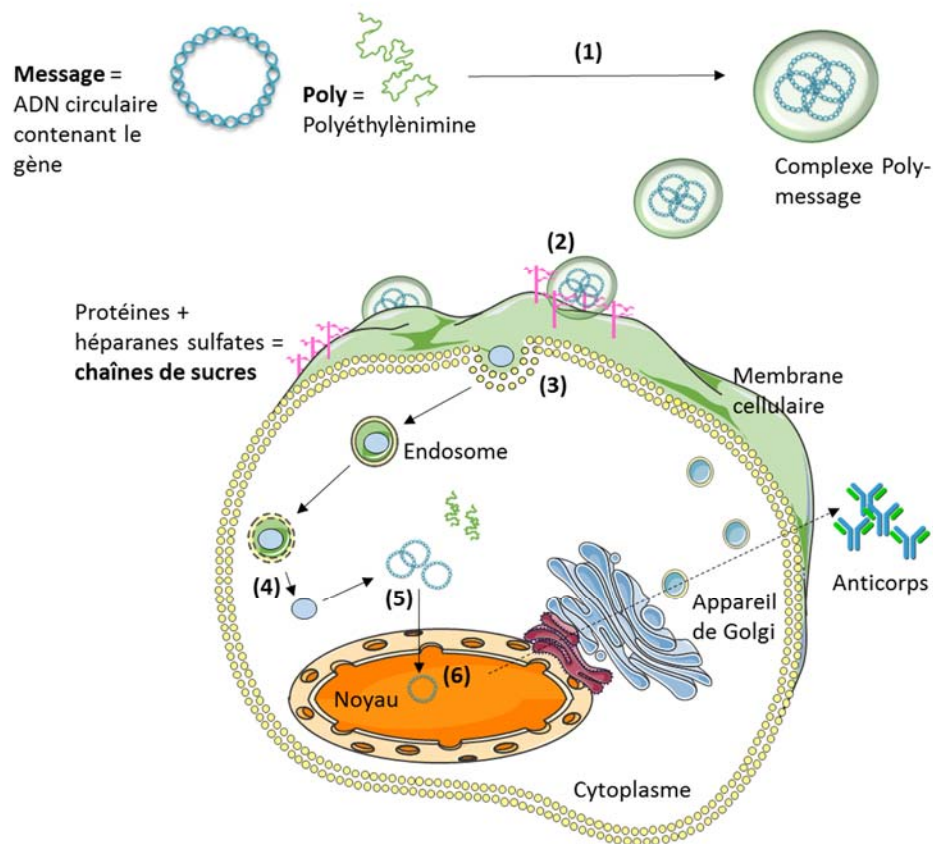
une entrée d'eau spectaculaire fait gonfler l'endosome qui finit par exploser et libère Poly proche du noyau de la cellule. Il est très difficile pour Poly d'avancer vers le noyau dans le cytoplasme visqueux de la cellule et sans savoir comment, elle se dissocie du gène contenant le message si important qu'elle devait livrer au noyau. Espérant que son message trouve le chemin qui l'emmènera à l'intérieur du noyau, Poly se replie dans une petite partie de la cellule et observe. Le gène est bien trop gros pour se faufiler au travers des petits pores qui traversent la membrane du noyau. C'est alors que Poly contemple avec étonnement la membrane de ce dernier se désorganiser et son contenu se condenser en forme de bâtonnets (les chromosomes). Le noyau renfermait toute l'information génétique essentielle à l'existence de la cellule qui est maintenant en train de se diviser pour donner naissance à deux cellules filles. Durant ce processus le noyau de la cellule se divise en premier, laissant la possibilité au gène porteur du message de traverser l'enveloppe du noyau. Par chance, le gène que Poly protégeait scrupuleusement est englobé dans le noyau de la cellule lorsque celui-ci se referme. Heureuse, Poly sait que son message va être pris en charge, déchiffré puis traduit en protéine, plus précisément en anticorps dans le cas du message de Poly.

Le processus biologique illustré précédemment est celui du transfert de gène permettant à une cellule de produire un anticorps. Les cellules préférentiellement utilisées sont celles de hamster chinois (CHO) car elles produisent des anticorps presque identiques à ceux des humains. Elles sont cultivées en laboratoire dans des conditions très spécifiques qui permettent leur division toutes les 14 à 16 heures. Ainsi la population cellulaire double rapidement jusqu'à obtenir plusieurs millions de cellules qui ensemble, vont pouvoir produire des quantités importantes d'anticorps. Ces derniers ont un potentiel thérapeutique élevé et permettent de soigner de nombreuses pathologies comme le cancer, les infections par des virus tels que les virus Zika et Ebola par exemple. A ce sujet, le président du LEEM (les entreprises du médicament) Christian Lajoux indique qu'« *un pays développé doit pouvoir faire bénéficier sa population de ces nouvelles voies de traitement. Il en va de son indépendance sanitaire, de sa capacité à anticiper les évolutions épidémiologiques nationales et à figurer en bonne place dans le « club » très envié des grands pays leaders en matière de santé* ».

Cette histoire expliquant le transfert de gène dans le but de produire un anticorps thérapeutique est dédiée à ma fille, Louise, ainsi qu'à tous les enfants et adultes curieux de connaître quelles sont les étapes de production d'un médicament biologique.

Laurence Delafosse

#### Illustration des étapes du transfert de gène pour la production d'un anticorps



- (1) Formation des Complexes (nommés polyplexes)
- (2) Attachement des Complexes à la Membrane Cellulaire
- (3) Internalisation des Complexes
- (4) Échappement du Compartiment Endosomal – Effet pompe à protons
- (5) Dissociation des Complexes
- (6) Entrée dans le Noyau

# Introduction

## Contexte Historique et Biotechnologique

La production de protéines recombinantes (r-protéines) à usage thérapeutique, industrielle ou encore utilisées dans des activités de recherche, est une biotechnologie en forte croissance dont l'essor découle essentiellement de trois révolutions scientifiques (figure 1) : premièrement, l'avancement des connaissances dans le domaine de la génétique, puis le développement d'outils moléculaires performants, et enfin l'accumulation de données biologiques issues des programmes internationaux de séquençage des génomes [1].

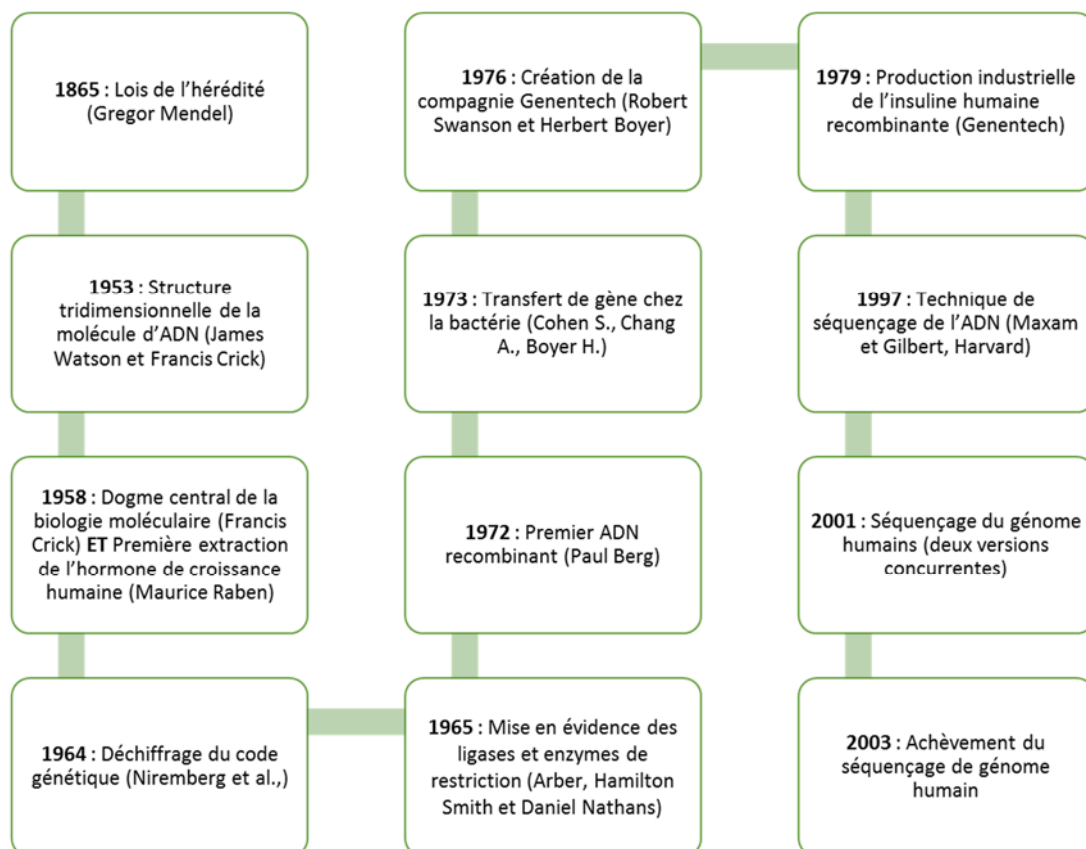
La créativité et la rigueur expérimentale du botaniste Gregor Mendel ont mené à la découverte de la transmission des caractères biologiques au cours des générations en 1865. Toutefois, la valeur de ces travaux sera reconnue par la communauté scientifique en 1900 (« lois de Mendel » [2]), et marque ainsi l'évolution de la biologie qui devient moléculaire. James Watson et Francis Crick, inspirés par les analyses cristallographiques de Rosalind Franklin et Maurice Wilkins, élucident en 1953 la structure tridimensionnelle en double hélice inversée de l'acide désoxyribonucléique (ADN) [3]. Peu de temps après cette découverte, Francis Crick s'interroge sur l'implication biologique de la molécule d'ADN et publie en 1958 son interprétation des différents éléments clés de la synthèse protéique concluant comme suit : « *I hope I have been able to persuade you that protein synthesis is a central problem for the whole of biology, and that it is in all probability closely related to gene action* » [4]. Son raisonnement met en évidence que l'information génétique est transmise de manière unidirectionnelle entre la molécule d'ADN, puis d'ARN (acide ribonucléique) et enfin la protéine selon ce qu'il appelle le dogme central de la biologie moléculaire [5]. Bien que l'existence d'un code reliant un triplet de nucléotides (ADN, ARN) à un acide aminé (protéine) ait été avancé par Francis Crick dans sa publication de 1958 [4], celui-ci est seulement déchiffré en 1964 [6–8]. À peu près au même moment, la mise en évidence des enzymes de restriction [9] et ligases (première isolation en 1968) participe au développement d'outils moléculaires performants dans le but de manipuler les caractéristiques génétiques. Ce faisant le biochimiste Paul Berg et son équipe produisent, au début des années 1970, le premier ADN recombinant en intégrant l'opéron galactose de la



bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*) à la molécule d'ADN circularisée du virus simien (SV40) [10]. En 1973, Stanley Cohen, Annie Chang et Herbert Boyer ouvrent l'ère de la transgénèse en introduisant par transformation [11] une molécule d'ADN circulaire recombinante (plasmide [12]) dans la bactérie *E. coli*. Enthousiaste de cette découverte, le jeune entrepreneur Robert Swanson fonde avec Herbert Boyer la compagnie *Genentech* en 1976. Une année plus tard et avec la collaboration de *Beckman Research Institute*, *Genentech* produit avec succès la première protéine recombinante humaine : l'hormone somatostatine [13]. Avec l'objectif d'appliquer les nouvelles techniques du génie génétique au traitement des maladies humaines, le groupe de Herbert Boyer crée une version synthétique du gène humain de l'insuline et l'introduit dans la bactérie *E. coli* afin de synthétiser la protéine [14,15]. En quelques années, *Genentech* prouve à la communauté scientifique et au milieu des affaires la pertinence de l'usage des technologies à ADN recombinant pour le développement de produits à intérêts thérapeutiques, et inaugure ainsi une toute nouvelle industrie. De nos jours, la production de r-protéines est une biotechnologie usuelle qui peut être pratiquée jusqu'à une échelle industrielle. Dans la plupart des applications en recherche et développement, une expression transitoire du gène d'intérêt est suffisante et permet d'obtenir un rendement de l'ordre de plusieurs grammes en quelques jours [16]. En 2003, l'achèvement du projet public international de séquençage du génome humain crée une opportunité de croissance économique aux entreprises biotechnologiques qui espèrent des développements de diagnostics et de thérapies basés sur les données du génome. Depuis, ces entreprises se sont développées partout dans le monde et on ne dénombre pas moins de 2 349 compagnies biotechnologiques aux États-Unis en 2013 [17].

La production de r-protéines à intérêts thérapeutiques est le secteur des biotechnologies qui a connu la plus forte croissance en 2013 (*BBC Research* 2015 rapporte jusqu'à 15 % d'augmentation [17]). Parmi les r-protéines thérapeutiques produites aujourd'hui en grande quantité par génie génétique, on trouve des molécules d'origine naturelle tel que les interférons, interleukines, facteurs de coagulations, hormones, etc. D'autres molécules thérapeutiques ont été mises au point grâce aux biotechnologies telles que les anticorps monoclonaux (reconnaissant des cibles spécifiques dans l'organisme) et des vaccins recombinants. Actuellement, l'érythropoïétine (EPO), une protéine et plus précisément une hormone, mène le marché des r-protéines en terme de revenu global (25 % des revenus de ce secteur [17]). L'EPO,

principalement produite par le rein, agit sur la moelle osseuse stimulant la production des érythrocytes, en d'autres termes : les globules rouges. Grâce à ses propriétés, cette hormone a permis à des milliers de patients souffrant d'anémie de vivre normalement. L'hématologie, le diabète, l'endocrinologie et l'oncologie deviendront d'ici 2019 les domaines thérapeutiques principaux de la production de r-protéines d'après le rapport 2015 de *BBC Research* [17]. Aujourd'hui, la production de r-protéines est un défi majeur tant pour répondre à la demande croissante de r-protéines thérapeutiques que pour l'identification de nouvelles cibles et autres activités de recherches. Afin de répondre à cette problématique, les entreprises biotechnologiques investissent massivement dans l'optimisation des procédés et systèmes d'expression, la mise au point de milieux de culture, l'optimisation des profils de glycosylation, l'amélioration des performances et rendements de purification.



*Figure 1 : Repères historiques du développement des biotechnologies.*

Le portefeuille « Thérapeutiques en santé humaine » (TSH) du Conseil National de recherche du Canada (CNRC, structure d'accueil pour ce travail) a pour mission d'assister les entreprises biotechnologiques principalement canadiennes et plus largement la communauté scientifique à développer des produits biologiques [18]. La production de grande quantité de r-protéines y est un défi quotidien afin de supporter les phases de développement préclinique, clinique précoce et de caractérisation d'un produit biologique.

## **Objectifs de la Thèse**

Sans ordre de priorité, le premier objectif de cette thèse est d'approfondir nos connaissances concernant les mécanismes et acteurs principaux du transfert de gène dans le but d'améliorer les performances des plateformes de production transitoire en cellules CHO (*Chinese hamster ovary*) et HEK293 (*human embryonic kidney 293*). Le second objectif est de préciser le rôle individuel des protéoglycanes à héparane sulfate quant à leur capacité de liaison et d'internalisation des polyplexes, mais également leur permissivité vis-à-vis de l'expression d'un transgène.

## **Contributions de Chacun des Auteurs aux Articles**

### **Article 1 : Comparative study of polyethylenimines for transient gene expression in mammalian HEK293 and CHO cells**

Auteurs : Laurence Delafosse, Ping Xu et Yves Durocher

État actuel de l'article : Publié dans *Journal of Biotechnology*.

Ma contribution concerne la définition du sujet et ses limites, la conceptualisation et l'exécution des expériences, l'analyse des résultats et leur présentation. J'ai également réalisé la bibliographie sur le sujet, écrit le manuscrit et effectué les corrections demandées par les examinateurs.

Ping Xu a supervisé l'analyse des échantillons par RMN et participé à la compréhension des résultats obtenus.

Yves Durocher a supervisé l'ensemble de l'étude et également, relu et corrigé le manuscrit avant de procéder à sa soumission.

## **Article 2 : Intracellular trafficking of polyethylenimine/syndecan-1 complexes in HEK293 cells**

Auteurs : Laurence Delafosse, Sébastien Paris, Yves Durocher

État actuel de l'article : Soumis dans *Journal of Controlled Release*.

Ma contribution concerne la conceptualisation et l'exécution des expériences ainsi que l'analyse et la présentation des résultats. J'ai largement contribué à la rédaction du manuscrit et réalisé la bibliographie sur le sujet.

Sébastien Paris a défini le sujet, ses limites, effectué les expériences préliminaires et contribué à la rédaction du manuscrit.

Yves Durocher a supervisé l'ensemble de l'étude et également, relu et corrigé le manuscrit avant de procéder à sa soumission.

## **Article 3 : Role of Sulfated Glycosaminoglycans and Glypicans in polyethylenimine-mediated gene transfer of CHO and HEK293 cells**

Auteurs : Laurence Delafosse et Yves Durocher

État actuel de l'article : En préparation.

Ma contribution concerne la conceptualisation et l'exécution des expériences. J'ai défini le sujet et ses limites, réalisé la bibliographie sur le sujet, analysé les résultats et écrit le manuscrit.

Yves Durocher a supervisé l'ensemble de l'étude, participé à l'interprétation des résultats, relu et corrigé le manuscrit.

# Chapitre 1 : Revue de Littérature

## La Production de Protéines Recombinantes

Une protéine recombinante (r-protéine) est le produit d'une cellule dite « hôte » dans laquelle du matériel génétique recombinant a été introduit par transfert de gène. Un système de production adapté à la fabrication de r-protéines, est un processus biotechnologique qui s'appuie principalement sur

- L'utilisation d'un **vecteur d'expression** qui code pour un gène d'intérêt.
- L'emploi d'un système d'expression, i.e. une **cellule hôte** chargée d'exécuter les instructions fournies par le gène d'intérêt et de synthétiser la r-protéine.
- Le **transfert du gène** d'intérêt dans la cellule hôte sans endommager celle-ci.
- Une phase de **production** et de **purification** de la r-protéine.

Les applications de la production de r-protéines sont nombreuses et de manière non exhaustive une r-protéine peut être produite dans un but thérapeutique, pour le criblage de cibles thérapeutiques ou encore dans le cadre d'études fonctionnelles et structurales, etc. (figure 2).

Protéines recombinantes	Identification de nouvelles cibles moléculaires
	Protéines thérapeutiques
	Vaccins
	Thérapie génique
	Thérapie cellulaire
	Diagnostic, nouveaux outils
	Agriculture
	Cosmétique
	Etudes structurales
	Etudes fonctionnelles
	Recherche académique

*Figure 2 : Champs d'application de la production de protéines recombinantes.*

## Les Systèmes d'Expression

Autrefois, les protéines étaient extraites de sang et d'organes humains ou animaux limitant les quantités disponibles et augmentant les risques liés à leur administration chez l'homme. Par exemple le traitement par l'hormone de croissance extraite d'hypophyses de cadavres bovins a causé des contaminations par des prions pathogènes occasionnant des cas de maladies de Creutzfeldt-Jakob mortelles. De nos jours, les protéines que l'on qualifie de recombinantes sont produites grâce à un procédé biotechnologique faisant intervenir une large gamme de systèmes d'expression : les bactéries, levures, cellules d'insectes, cellules végétales ou encore de mammifères, présentant chacun des avantages et inconvénients.

### Les Systèmes d'Expression Procaryotes

Au début des années 1980, la première r-protéine approuvée et mise sur le marché (sous le nom d'*Humuline*, Eli Lilly) fut l'insuline et produite grâce à une souche atténuée de la bactérie commune et généralement inoffensive *E. coli* [19]. Ce colibacille a été découvert en 1885 par Theodor Escherich et son patrimoine génétique entièrement séquencé en 1997 [20]. Par ailleurs, *E. coli* est facile à manipuler au laboratoire et se prête bien à la culture de masse en fermenteur (une division cellulaire toutes les 20 minutes dans un milieu riche). Son ancienneté et sa culture aisée en font un outil d'étude de choix en biologie moléculaire comme en témoigne la profusion de publications scientifiques qui la citent. Le code génétique étant universellement conservé, les bactéries sont capables de produire des protéines humaines simples. À ce sujet, le Prix Nobel Jacques Monod a dit : « Tout ce qui est vrai pour la bactérie *E. coli* est vrai pour l'éléphant ». *E. coli* peut donc être utilisée comme micro-usine capable de produire rapidement une grande quantité de r-protéines (jusqu'à plusieurs grammes par litre) avec un faible coût de production. Jusqu'au milieu des années 90, *E. coli* occupait une position dominante dans la production de r-protéines par génie génétique [21].

L'accroissement de la demande pour des r-protéines plus complexes a mis en évidence les limitations de ce système d'expression. Effectivement, la bactérie n'est pas capable de mettre en œuvre les modifications post-traductionnelles (MPT) nécessaires à la stabilité et l'activité de nombreuses protéines humaines. De plus, les r-protéines produites dans *E. coli* ne sont

généralement pas secrétées, ce qui complexifie les étapes de purification et d'extraction, nuit aux rendements et augmente le risque de contamination du produit. Certaines bactéries, par exemple *Bacillus subtilis* ou *Streptomyces* possèdent des capacités de sécrétion supérieures à *E. coli* [22,23], cependant toutes les r-protéines approuvées pour l'usage humain sont à ce jour produites dans la bactérie *E. coli* [24].

La bactérie demeure un hôte de choix pour la production de r-protéines et on assiste depuis ces dernières décennies, à l'émergence d'une nouvelle discipline du génie génétique : l'ingénierie cellulaire. Dans ce sens, de nombreux efforts sont investis pour permettre aux bactéries la conversion systématique de l'information génétique en protéines glycosylées biologiquement actives [25]. En effet, il est possible d'augmenter l'efficacité de glycosylation de la bactérie et de manipuler la composition des glycanes. Par exemple, le transfert de la voie de synthèse des N-glycanes du micro-organisme *Campylobacter jejuni* dans la bactérie *E. coli* a été décrit en 2002 [26].

## **Les Systèmes d'Expression Eucaryotes**

### *Les Levures*

La levure est un eucaryote inférieur qui permet la production de r-protéines plus complexes dans la mesure où ils réalisent des MPT élémentaires tel que la glycosylation simple, la carboxylation, la formation de ponts disulfures ou encore l'acylation. Ce système d'expression offre les mêmes facilités expérimentales et industrielles que les bactéries. Le premier exemple de vaccin efficace produit grâce à la levure date de 1984. En effet, *Saccharomyces cerevisiae*, communément appelée la levure du boulanger car utilisée principalement dans l'alimentation, a permis la production du vaccin commercial contre l'hépatite B (antigène HB) [27]. Néanmoins, son faible rendement de production et l'hypermannolysation des protéines (glycosylation indésirable rapportée comme étant allergénique pour l'homme) limitent son utilisation pour la production de r-protéines à intérêt thérapeutique [28]. De ce fait, plusieurs autres systèmes d'expression alternatifs ont été développés et améliorés dans le but de permettre une N-glycosylation des protéines plus fidèle à la glycosylation humaine [29–31]. Parmi les systèmes d'expression bien établis actuellement on trouve les levures *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*,

*Kluyveromyces lactis* et *Schizosaccharomyces pombe*. Bien que leur expression cytoplasmique soit élevée (par exemple 22 g/L d'hydroxynitrile lyase de l'hévéa [32], ou encore 12 g/L du fragment C de la toxine tétanique [33]), leur capacité de sécrétion des r-protéines de grandes tailles est faible limitant leur rendement final de production. Avec l'avancement des connaissances en matière d'ingénierie de la glycosylation chez les levures et la possibilité d'augmenter la sécrétion des r-protéines de grandes tailles, les levures pourraient devenir un système de production essentiel dans les années à venir [28,34].

### *Les Cellules d'Insectes*

Les cellules d'insectes sont une alternative intéressante pour la production de r-protéines humaines car elles sont cultivables en suspension, permettent un haut rendement de production et effectuent la plupart des MPT y compris les O- et N-glycosylations. En effet, les premières étapes de la voie de synthèse des N-glycanes sont identiques à celles des cellules de mammifères [35]. Cependant, les sucres complexes (i.e. sialylés) ne sont pas synthétisés par les cellules d'insectes. Dans une stratégie d'« humanisation » de ce mode de production, le système baculovirus / cellules d'insectes peut être utilisé pour la production de r-protéines complexes dans lequel le baculovirus exprime les glycosyltransférases manquantes. De manière similaire, la construction de virus permettant la production de r-protéines ou d'anticorps sialylés dans les cellules d'insectes fait l'objet de plusieurs études [36,37]. Contrairement à ce qui est observé chez les mammifères, on trouve deux types de résidus de fucose chez les cellules d'insectes : les fucoses  $\alpha$ 1-3 et  $\alpha$ 1-6. La présence de résidu de fucose  $\alpha$ 1-3, épitope allergénique absent chez l'homme, constitue une sérieuse limitation à l'utilisation de ce système pour obtenir des r-protéines à intérêt thérapeutique [38]. Certaines lignées (*Spodoptera frugiperda* 9 ou 21) expriment uniquement l'activité  $\alpha$ 1-6 fucosyltransférase.

### *Les Plantes Transgéniques*

Bien qu'aucune r-protéine thérapeutique issue des systèmes d'expression végétaux ne soit encore commercialisée, plusieurs sont à l'étape des essais précliniques et cliniques [39] (albumine humaine, glucocérébroside humaine, lactoferrine, lipase gastrique). Plusieurs entreprises, tels que *Medicago Inc.*[40] (Canada) et *Planet Biotechnology Inc.*[41] (États-Unis)



proposent également la production à grande échelle d'anticorps recombinants et vaccins. L'avantage principal de ce système d'expression est l'obtention d'un rendement de production élevé avoisinant 10 kilogrammes (kg) de r-protéines par acre de culture de tabac, maïs, soja ou encore luzerne [42]. La maîtrise de la transgénèse végétale dans le but de produire des r-protéines d'intérêts est une alternative intéressante aux systèmes d'expression standards car permet une production rapide de masse avec un faible coût d'opération et réduit l'hétérogénéité du produit obtenu (clonage naturel). Néanmoins, il est essentiel de recourir à une stratégie « d'humanisation » des r-protéines par l'expression d'enzymes humaines comme la galactosyltransférase et la sialyltransférase. Pour la même raison, il est également nécessaire d'inhiber (par RNAi) les enzymes fucosyltransférase et xylosyltransférase [43]. D'autre part, il existe un risque de dissémination (pollen) et de contamination par les insectes, les bactéries du sol et les sous-produits de la plante. Afin de satisfaire aux directives des bonnes pratiques de fabrication (BPF), l'investissement d'équipements pour des serres de haut niveau de biosécurité est fondamental.

### *Les Cellules de Mammifères*

Le système d'expression en cellules de mammifères est le plus utilisé pour la production de r-protéines. En effet, avec le développement des technologies de culture cellulaire à grande échelle, conjointement avec l'accroissement de la demande pour les anticorps recombinants humains ou humanisées de ces dernières années, la grande majorité des r-protéines sont produites dans les cellules de mammifères (de 60 à 70 % [44]). L'avantage de ce système d'expression réside dans la production de r-protéines ayant subis des MPT propres aux mammifères. Par exemple, la formation de pont disulfure, qui est un élément de structure tertiaire (repliement de la protéine) ou quaternaire (association de sous-unités protéiques), est difficile à obtenir dans les systèmes d'expression bactérien [45]. La glycosylation, quant à elle, a un rôle clé dans le maintien de la structure, la stabilité et la fonction d'une protéine. Elle peut aussi influencer sa pharmacocinétique et son immunogénicité. De ce fait la ressemblance de la r-protéine à la forme native de la protéine humaine est essentiel dans les études biologiques ou dans le cadre d'une application thérapeutique.

Les cellules d'ovaires de hamsters chinois (*Chinese hamster ovary*, CHO) sont les plus fréquemment utilisées pour la production de masse de r-protéines [44]. Isolées par Theodore Puck à la fin des années 1950 [46], le succès des cellules CHO résulte de leur adaptation à la culture en suspension en bioréacteur, leur capacité à intégrer un transgène de manière stable et à produire des MPT compatibles avec l'usage humain. De plus, le génome de plusieurs lignées cellulaires CHO a été séquencé et représente un outil utile pour la communauté scientifique [47,48]. De surcroît, la première r-protéine thérapeutique produite dans les cellules de mammifères fut produite dans les cellules CHO [44]. Il s'agit de l'activateur du plasminogène tissulaire recombinant (rt-PA) qui a été approuvée pour utilisation clinique en 1987. De ce fait, d'un point de vue réglementaire, l'utilisation de cet hôte cellulaire pour la production de r-protéine d'intérêt thérapeutique faciliterait le processus d'approbation par l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) et/ou l'agence européenne des médicaments (EMA). Combinés, ces nombreux avantages encouragent les industries pharmaceutiques à utiliser et investir largement dans plusieurs stratégies de développement de lignées cellulaires CHO. Un résumé des principaux avancements dans le domaine de l'ingénierie cellulaires des CHO pour la production industrielle de r-protéines est proposé dans la revue « *The art of CHO cell engineering : A comprehensive retrospect and future perspectives* » [49]. Les cellules rénales de bébé hamster (*baby hamster kidney*, BHK) et les cellules murines NS0 sont aussi largement utilisées notamment pour la production d'anticorps monoclonaux [50]. Présentant l'avantage potentiel de la glycosylation humaine, les cellules rénales embryonnaires humaines 293 (*human embryonic kidney*, HEK293) et plus récemment les cellules de rétine humaine (Per.C6) et les cellules provenant d'extrait d'amniocytes (Cap-T cells) sont communément employées pour la production rapide de r-protéines [51]. Les cellules HEK293 sont les plus fréquemment utilisées car elles permettent la production rapide de plusieurs milligrammes voire grammes de r-protéines. Un rendement de production avoisinant 1 g/L de r-protéines a été observé pour les lignées améliorées 293-E [52,53]. La lignée cellulaire 293-E expriment la protéine EBNA1 du virus *Epstein-Barr* (EBV) et supporte ainsi la persistance épisomale du plasmide contenant une origine de répllication du virus EBV. L'expression du transgène, bien que transitoire, est donc prolongée. Les cellules Per.C6 ont l'avantage d'une très haute densité de croissance (jusqu'à  $1 \times 10^7$  cellules par millilitre) ce qui réduit les coûts associés au milieu de culture et supporte un haut rendement de production [50]. Enfin, les cellules Cap-T ont démontré

des capacités de sécrétion accrues et sont capables de produire des r-protéines complexes et considérées comme difficiles à exprimer [54].

Malgré les nombreux efforts investis dans l'amélioration de ce système d'expression, des inconvénients majeurs subsistent tels que des coûts de production élevés et une transposition à grande échelle difficile.

## **Choix du Système d'Expression**

### *Généralités*

Le système d'expression idéal doit produire fidèlement la r-protéine, être rentable en termes de productivité et de coûts, être rapide et simple d'utilisation, permettre de conserver facilement la r-protéine et comporter peu ou aucun risque quand celle-ci est produite dans un but thérapeutique (points à considérer en figure 3). Malheureusement, un tel système d'expression n'existe pas. Le choix du système d'expression le plus pertinent est donc principalement guidé par les modifications que la r-protéine doit subir pour être biologiquement active. Bien que la glycosylation soit un mécanisme conservé qui se produit chez les levures, insectes, plantes et animaux, le profil de glycosylation d'une r-protéine est significativement différent selon le système d'expression choisi. De plus, parmi les diverses lignées cellulaires utilisées, il existe également une disparité du profil de glycosylation qui pourrait altérer l'activité de la r-protéine [55]. Brièvement, les cellules de mammifères sont préférentiellement utilisées pour la production de r-protéines surtout quand celles-ci sont glycosylées et d'intérêt thérapeutique. Les systèmes d'expression bactériens et eucaryotes inférieurs sont privilégiés pour la production de r-protéines simples, dans des délais plus courts. La répartition actuelle des systèmes d'expression utilisés pour la production industrielle de produits biologiques est présentée figure 4. Enfin, bien que la production de r-protéines grâce aux plantes transgéniques offre une alternative intéressante en termes de rendement et coût, elle ne peut pas ou très difficilement être mise en place dans les laboratoires traditionnels. De nombreux efforts sont entrepris pour améliorer les différents systèmes d'expression nécessitant des investissements considérables en capital et, de ce fait, augmentant les coûts de production des r-protéines. Cependant, lorsqu'une

quantité industrielle de r-protéine est nécessaire, il est important de diminuer son prix de revient en augmentant les rendements et / ou la rapidité du processus de production.

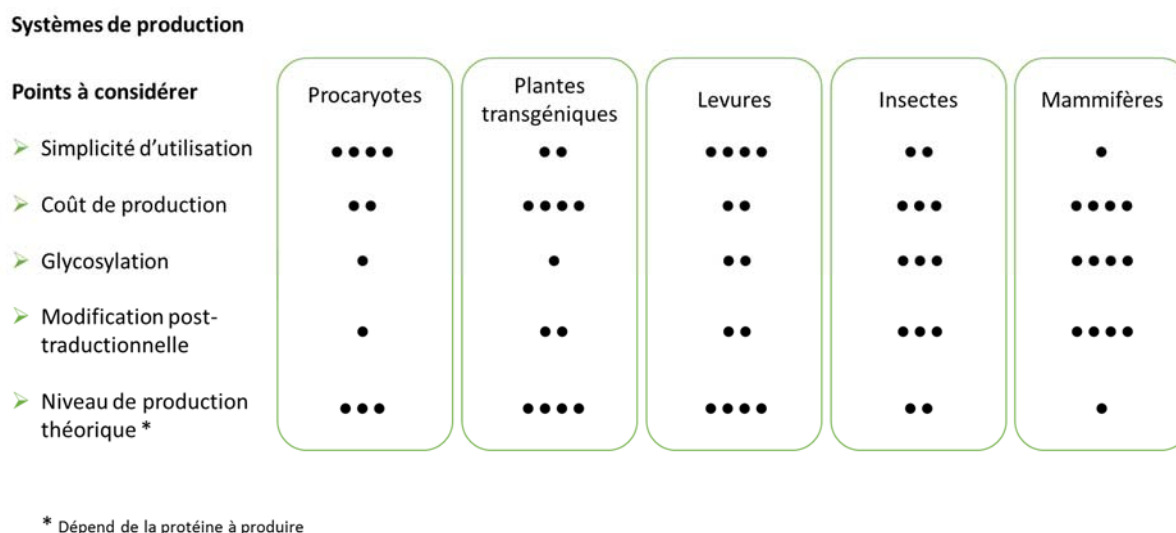
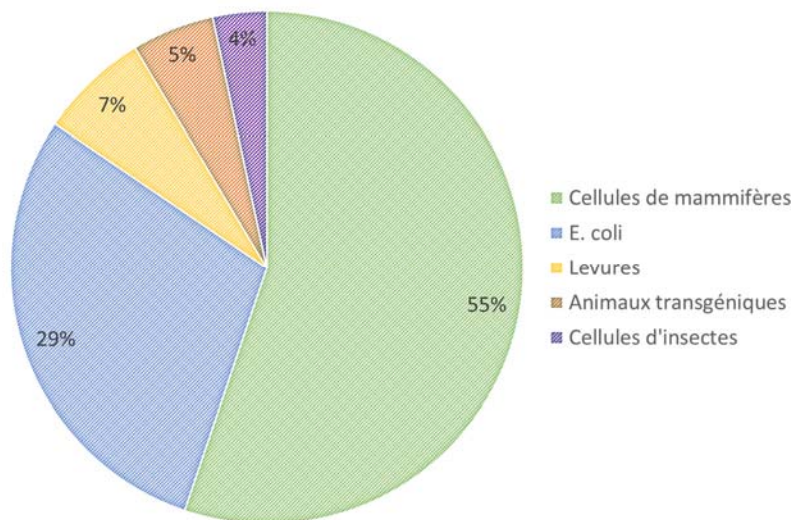


Figure 3 : Comparaison des différents systèmes d'expression.

### *Expression Stable ou Expression Transitoire*

Dans le but de produire de grandes quantités de r-protéines, les cellules hôtes utilisées peuvent exprimer un gène d'intérêt de manière stable ou transitoire. Dans le cas d'une expression stable, le gène d'intérêt s'intègre au génome de la cellule hôte et est ainsi conservé au cours des divisions cellulaires. L'occurrence de cette intégration est cependant rare, et nécessite une ou plusieurs phases de sélection des cellules qui ont intégré de manière stable le transgène (sélection d'une population clonale). De manière générale, il s'agit d'un procédé long et fastidieux [56]. Devant le besoin croissant d'une production rapide et efficace de r-protéines à intérêt thérapeutique, l'expression transitoire à grande échelle constitue un moyen d'accélérer la production. En effet, suite à une expression transitoire d'un gène d'intérêt, il est possible d'obtenir en quelques jours des quantités de r-protéines de l'ordre de plusieurs milligrammes voire grammes de r-protéines [16].



*Figure 4 : Répartition des systèmes d'expression utilisés pour la production industrielle de produits biologiques.*

*Cette répartition est basée sur les données des produits biologiques approuvés entre 2006 et 2010.*

#### *Système d'Expression Choisi dans le Contexte de cette Thèse*

Le système d'expression utilisé dans le contexte cette thèse est la cellule de mammifère et particulièrement les cellules CHO et HEK293. Alors que les cellules CHO sont encore préférentiellement utilisées pour l'expression stable de r-protéines thérapeutiques, les cellules HEK293 demeurent les plus couramment utilisées pour l'expression transitoire. En effet, l'expression transitoire à grande échelle dans les cellules CHO affiche une efficacité et une productivité plus faible en comparaison des cellules HEK293 [53]. Cependant, d'un point de vue règlementaire, l'utilisation des cellules CHO est un avantage. Ainsi, les paragraphes suivants présentent et discutent plusieurs aspects du transfert de gène (transfection) appliqués aux cellules de mammifères CHO et HEK293 dans le but de produire de manière rapide une grande quantité de r-protéines.

## **Les Techniques de Transfert de Gène**

Depuis sa découverte [10], le transfert de gène est devenu une technique expérimentale indispensable en biologie cellulaire et moléculaire. La méthode du transfert de gène permet d'introduire dans une cellule hôte une ou plusieurs copies d'un gène codant d'intérêt. Le transfert de celui-ci dans la cellule se fait par l'intermédiaire d'un ADN plasmidique recombinant (ADNp ou vecteur d'expression) généralement circulaire et contenant le gène d'intérêt accompagné de tous les éléments nécessaires à sa transcription (figure 5 : essentiellement un promoteur, une (des) origine (s) de réplication, des sites uniques de restrictions, un insert, un marqueur de transformation (le plus souvent un gène de résistance à un antibiotique) et un marqueur d'intégration (pour la sélection des cellules eucaryotes). De par sa nature polyanionique et sa taille, la pénétration passive de l'ADNp dans la cellule est improbable. Une multitude de méthodes et produits ont donc été développés pour faciliter son transfert dans la cellule hôte. En générale, les méthodes de transfert de gène peuvent se diviser en deux catégories : les approches biologiques basées sur l'utilisation d'un vecteur qui « transporte » le matériel génétique et les approches physiques (par exemple la microinjection, le bombardement de particules, l'électroporation, la sonoporation, l'irradiation par laser et la magnétofection qui sont détaillées dans l'Annexe 2).

### **Généralités sur les Vecteurs**

On qualifie de vecteur tout système permettant le transfert des acides nucléiques d'intérêt dans une cellule donnée. Il doit aussi assurer le franchissement des multiples barrières cellulaires et le cheminement efficace de sa « cargaison » jusqu'au noyau de la cellule hôte. Il existe deux grandes catégories de vecteurs, à savoir les vecteurs viraux (Annexe 3) et non-viraux. Historiquement, la vectorologie est une branche de la virologie moléculaire qui a émergé dans les années 1980 et qui cherche à utiliser des virus comme outils du transfert de gène [57]. Les vecteurs viraux sont dotés d'une capside identique à celle du virus original mais renferme un génome viral recombinant, complet ou plus souvent partiel, porteur du gène d'intérêt. A l'inverse de l'infection virale, l'entrée du vecteur dans la cellule ne conduit pas à la production de nouvelles particules virales mais permet le transfert du gène. Cependant, de nombreuses limitations ont été liées à leur utilisation dans le cadre de la thérapie génique (Annexe 3). Pour

s'affranchir de ces inconvénients, des vecteurs de synthèse (ou non-viraux) à base de motifs cationiques ont été développés. Les deux principales catégories de vectorisation non virale sont : la lipofection et la polyfection, exposées ci-après. Brièvement, les vecteurs de nature lipidique et polymérique sont capables de lier les phosphates anioniques et condenser l'ADNp pour former des nanoparticules appelées lipoplexes ou polyplexes [58]. Leur charge globale peut être négative, positive ou neutre dépendamment de la quantité de vecteurs utilisée. Pour être utile *in vitro*, ces vecteurs doivent avoir un bon rapport efficacité de transfection / cytotoxicité afin de soutenir un rendement de production robuste.

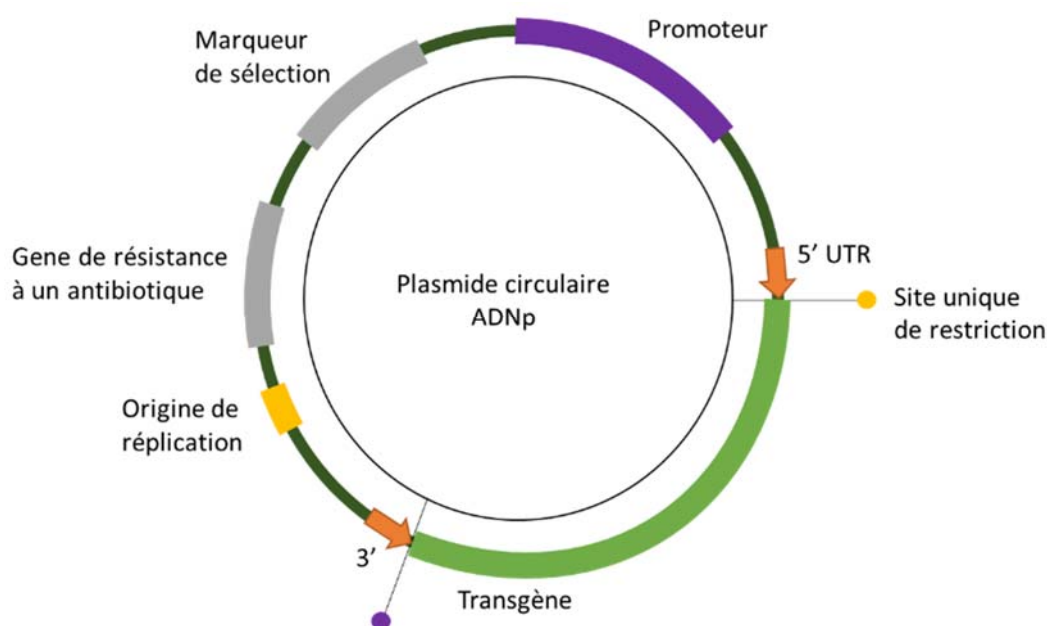


Figure 5 : Les différentes composantes d'un plasmide classique ou vecteur d'expression.

### *Les Vecteurs de Nature Lipidique*

Les liposomes, qui ont la capacité de fusionner avec les membranes cellulaires, ont initialement été envisagé pour le transfert de gène dans une cellule hôte [59]. Après plusieurs essais fructueux de transfert de matériels génétiques encapsulés dans des liposomes [60,61], le Dr. Felgner et ses collaborateurs synthétisent chimiquement le premier lipide cationique en 1987 (DOTMA :

chlorure de N-[1-(2,3-dioléoxy) propyl]-N,N,N-triméthylammonium) [62]. Depuis, de nombreux lipides cationiques ont été développés et commercialisés [63,64]. Ces lipides peuvent être monocationiques, polycationiques ou dérivés du cholestérol. Les exemples les plus significatifs de lipides mono et polycationiques sont exposés dans les paragraphes suivants. Les lipides dérivés du cholestérol ayant été développés principalement dans le but d'appliquer la lipofection *in vivo*, ils ne seront pas abordés. Brièvement, les lipides cationiques composés de dérivés du cholestérol (constituant naturel des membranes cellulaires modulant leur rigidité) possèdent des caractéristiques biologiques intéressantes comme une stabilité supérieure dans un milieu de force ionique élevée et une meilleure activité fusogénique que les lipides cationiques à double chaîne aliphatique.

De manière générale, la structure chimique des lipides cationiques se compose de trois domaines distincts :

- Une **tête polaire** (ou hydrophile) chargée positivement de par la présence d'une ou plusieurs fonctions amines protonées. Par conséquent, une attraction électrostatique se produit avec les groupements phosphates de l'ADNp.
- Un **pôle hydrophobe** composé soit de deux chaînes hydrocarbonées saturées ou non (huit carbones par chaîne au minimum), soit d'un dérivé du cholestérol. Ces chaînes favorisent la déstabilisation des membranes plasmiques riches en lipides.
- Un **connecteur** ou « espaceur » reliant la partie hydrophile et hydrophobe. La nature chimique et la taille du connecteur influencent la stabilité et la biodégradabilité du vecteur. Par exemple, des liens clivables ont été créés favorisant le relargage de l'ADNp.

De plus, les lipides cationiques sont souvent utilisés en association avec le colipide zwitterionique DOPE (dioléoyl-phosphotidyléthanolamine, figure 6) qui favorise la lipofection par ses propriétés fusogéniques. Ce colipide est également capable d'induire une déstabilisation de la membrane des endosomes durant leur acidification [65] permettant la libération du vecteur lipidique et sa cargaison (ADNp) dans le cytoplasme de la cellule.



## Les Lipides Monocationiques

Le DOTMA (figure 6), mis au point en 1987, est un lipide monocationique qui a fait ses preuves dans la lipofection efficace de différentes lignées cellulaires. Il est composé de deux chaînes monoinsaturées et d'une tête cationique de type ammonium quaternaire, reliées par un connecteur 2,3-propyl-di-oxy [62]. Le mélange DOTMA / DOPE avec un rapport massique de 1/1 est aujourd'hui disponible commercialement sous le nom de Lipofectine (Thermo Fisher Scientific). Dans le but d'améliorer les propriétés biologiques de ce vecteur synthétique, plusieurs analogues ont été développés dont le DOTAP (méthylsulfate de N-[1-(2,3 dioléoyloxy) propyl] N,N,N triméthylammonium, figure 6)[66]. Le remplacement des fonctions éthers du connecteur par des fonctions esters a, en effet, permis de réduire la cytotoxicité du vecteur lipidique. Aujourd'hui une multitude de lipides monocationiques possédant des variations au niveau de leurs trois domaines structuraux ont été synthétisés. L'évaluation de l'efficacité de lipofection de ces dérivés monocationiques a permis de mieux comprendre leurs relations structure chimique et activité biologique [67].

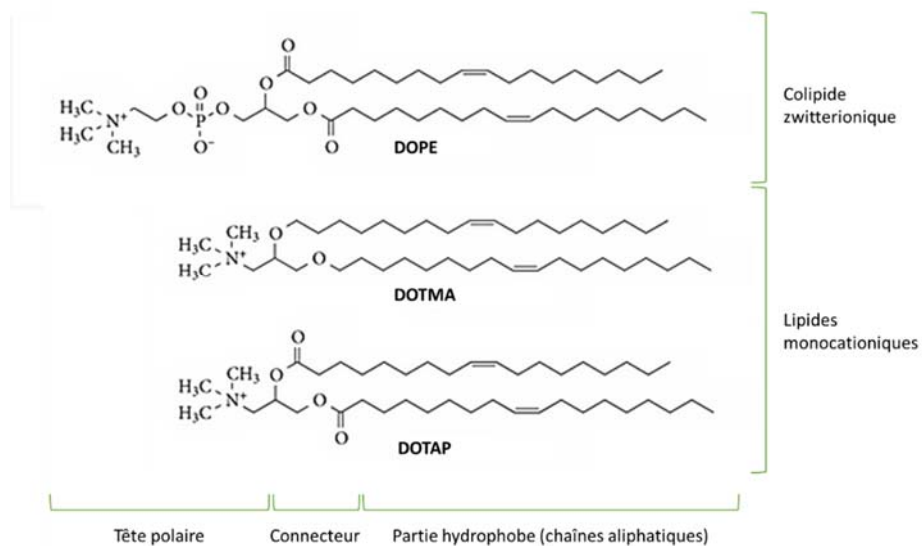


Figure 6 : Structures du colipide DOPE et des lipides monocationiques DOTMA et DOTAP.

## Les Lipides Polycationiques

Le premier lipide polycationique, une lipopolyamine dérivée de la spermine ou DOGS (dioctadecylamine-glycine-spermine, figure 7), fut décrit en 1989 par le Dr. Berh et son équipe [68]. Aujourd'hui, les lipoplexes DOGS/DOPE sont commercialisés sous le nom de Transfectam® (Promega). Depuis, divers analogues ont été mis au point tel que le DOSPA (2,3-dioleyloxy-N-[2-(spermine-carboxamido)éthyl]-N,N-dimethyl-1-propanammonium-trifluoroacétate, figure 7) commercialisé sous le nom de Lipofectamine™ (Thermo Fisher Scientific) lorsqu'il est mélangé avec le colipide DOPE (rapport massique de 3/1). Théoriquement, les lipides polycationiques ont une meilleure affinité pour l'ADNp et, en conséquence, une meilleure efficacité de transfection. Plusieurs études comparatives ont mis en évidence les caractéristiques communes des lipides cationiques les plus efficaces : une partie hydrophobe constituée de deux longues chaînes aliphatiques, une tête polaire deux fois plus courte et une liaison de type éther [69,70]. Ces observations démontreraient l'utilité d'une certaine proximité entre les chaînes aliphatiques et la tête cationique dans la formation des lipoplexes. L'ajout d'ADNp aux lipides cationiques en solution résulte en la formation de complexes nommés « lipoplexes ». La morphologie et la taille de ces complexes dépendent, entre autre, de la structure du lipide (encombrement stérique relatif entre la tête polaire et la partie hydrophobe) [71,72]. La taille des lipoplexes dépend également de la quantité de lipides cationiques utilisée qui est généralement supérieure à celle requise pour neutraliser les charges négatives de l'ADNp. Cet excès de lipides cationiques dans le mélange permet d'obtenir des lipoplexes dont la charge globale est positive. Ainsi formés, ils interagiraient avec les protéoglycanes membranaires (page 51) permettant leur internalisation dans la cellule.

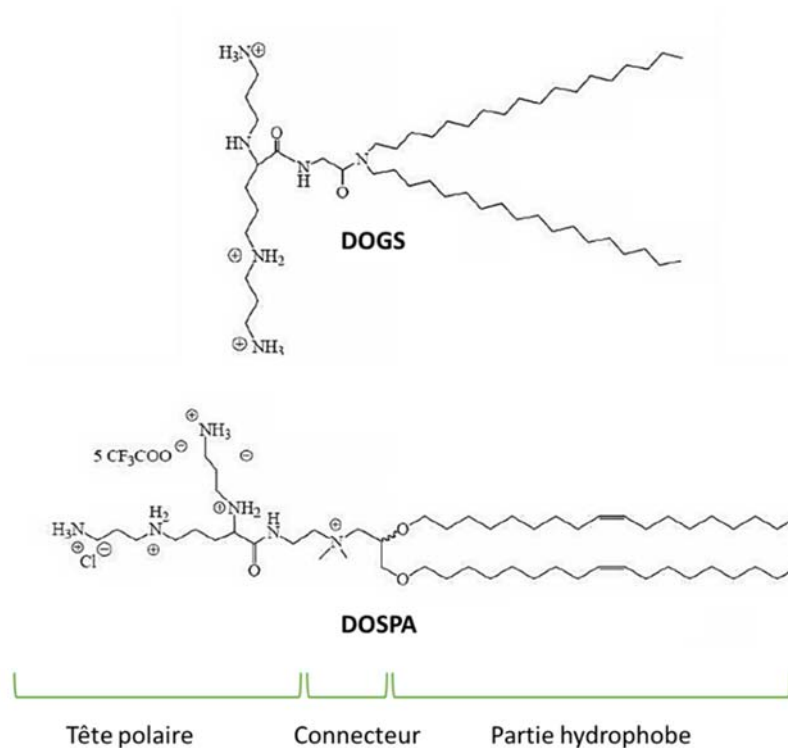


Figure 7 : Structures des lipides polycationiques DOGS et DOSPA.

### Les Vecteurs de Nature Polymérique

Les vecteurs synthétiques composés de polymères cationiques, sont particulièrement attractifs pour le transfert de gène en raison de leur simplicité d'utilisation, leur modularité, leur stabilité et leur solubilité en phase aqueuse.

#### La Polylysine

La polylysine est un polymère cationique composé de plusieurs lysines (comme son nom l'indique) qui sont caractérisées par la présence d'une fonction amine primaire à l'extrémité de la chaîne latérale (figure 8). Sa capacité à condenser l'ADN est connu depuis les années 1960 [73] et il est le premier polymère synthétique à avoir été utilisé pour le transfert de gène [74]. Son unité de base possédant une constante de dissociation acide ( $\text{pK}_a$ ) égale à 10.2, la polylysine est chargée positivement au pH physiologique (7.2) lui permettant d'interagir avec les acides nucléiques. De ce fait, de nombreux chercheurs se sont intéressés à l'effet « compactant » de ce

polymère [75–77] et, en général, seules les polylysines de poids moléculaires supérieurs à 3 kDa sont capables de former des complexes stables avec l'ADN (polyplexes) [78].

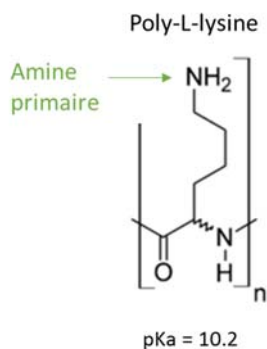


Figure 8 : Structure chimique de la poly-L-lysine.

Selon la chiralité du carbone central de la lysine, le polymère est composé de L-lysines (présentes à l'état naturel) ou D-lysines (produit artificiel). Contrairement aux particules de poly-L-lysine (PLL) qui sont biodégradables, la poly-D-lysine (PDL) est résistante aux dégradations enzymatiques et donc principalement utilisée comme agent de revêtement pour permettre l'adhérence cellulaire [79]. Bien que sa biodégradabilité soit un avantage (surtout pour des applications du transfert de gène *in vivo*), sa cytotoxicité accrue [80] et sa faible efficacité de transfection sont des limitations à l'utilisation de la PLL pour le transfert de gène [81]. Ses fonctions amines étant protonées au pH physiologique, la PLL ne possède pas de pouvoir tampon nécessaire à la sortie des polyplexes du compartiment endosomal [82]. Ceci explique sa faible efficacité de transfection en absence d'agents permettant la rupture des membranes endosomales tel que la chloroquine [83]. Néanmoins, lorsque la PLL est associée à un ligand permettant un ciblage cellulaire précis, son efficacité peut être améliorée. En effet, des études pionnières vers la fin des années 1980 ont montrées que la PLL conjuguée à la glycoprotéine asialoorosomucoïde permet de cibler les cellules hépatiques [74,84]. Depuis, une multitude de dérivés ont été synthétisés dans le but de diminuer la cytotoxicité de la PLL, faciliter la sortie endosomale des polyplexes mais aussi limiter l'agrégation des complexes [85–88].

## Les Dendrimères

Les dendrimères sont des polymères ramifiés de type polyamidoamines (PAMAM, Starbust<sup>TM</sup>) développés initialement par les Dr. Szoka et Haensler [89]. Ils sont caractérisés par une structure sphérique dont la taille est liée au nombre de cycles de polymérisation lors de la synthèse (degré de réticulation exprimé en génération, figure 9). Ils sont composés d'un grand nombre de fonctions amines soit primaires en surface soit tertiaires à l'intérieure. Cette forte densité de fonctions amines primaires confère à ce vecteur synthétique une capacité accrue à condenser les acides nucléiques [90]. Les complexes PAMAM / ADNp adoptent majoritairement une forme de toroïde visible en microscopie électronique [91]. Leur efficacité de transfection dépend du nombre de fonctions amines primaires présentes en surface du polymère et de sa taille [91,92], les polyplexes formés avec des dendrimères de génération supérieure à 5 étant les plus performant [93]. Tout comme le polyéthylèneimine (page 24), les dendrimères sont parmi les vecteurs synthétiques les plus étudiés pour le transfert de gène [94] et ces derniers présentent l'avantage d'être biodégradables. Leur capacité intrinsèque de transfert de gène peut être améliorée en employant des modifications chimiques [81] (combinaison de la structure de base avec des peptides fusogènes, des motifs de ciblage cellulaires, etc. ) ou physiques (dégradation par la chaleur formant des complexes plus stables et moins toxiques [95]). Toutefois, il existe une grande variabilité d'efficacité de transfection en fonction des lignées cellulaires et sa cytotoxicité augmente considérablement avec son degré de réticulation [96,97]. De plus, la synthèse des dendrimères est longue, fastidieuse [98] et l'achat de solutions commerciales dispendieux (Superfect et Polyfect de Qiagen).

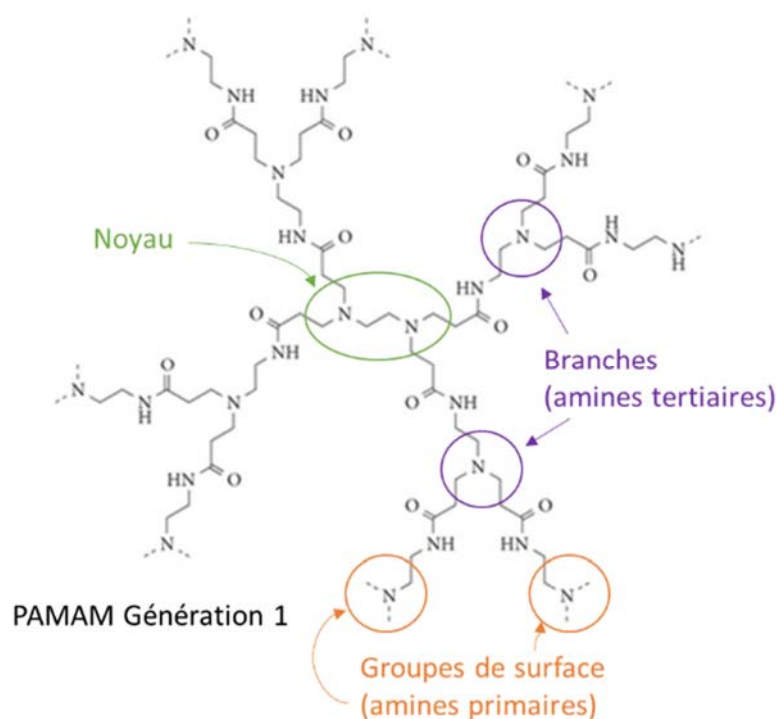


Figure 9 : Structure chimique du dendrimère polyamidoamine (PANAM).

## Le Chitosan

Le chitosan (figure 10) est un polymère attrayant pour le transfert de gène en raison de son excellente biocompatibilité, sa biodégradabilité et sa faible toxicité [99–101]. Il est donc largement étudié pour le transfert de gène dans les conditions *in vitro* et *in vivo* depuis les deux dernières décennies [81,102]. Le chitosan est un polyside provenant de la désacétylation chimique ou enzymatique de la chitine, un composant naturel de l'exosquelette des insectes et crustacés [103]. Sa structure chimique présente des groupements amines primaires et hydroxyles qui lui confèrent une densité de charge positive indispensable aux interactions avec les acides nucléiques. *In vitro*, les études des relations entre la structure et l'efficacité du chitosan ont permis d'identifier les paramètres importants à considérer lors du transfert de gène : le degré de désacétylation, le poids moléculaire et la quantité de chitosan par rapport à celle de l'ADNp [101,104–108]. Si nous prenons comme exemple le poids moléculaire, les études révèlent que les chitosans de hauts poids moléculaires condensent l'ADNp efficacement et forment des complexes stables qui sont cependant peu solubles au pH physiologique [81,109]. Les chitosans

de faibles poids moléculaires ( $\leq 30$  kDa) ont une meilleure efficacité de transfection [106,110,111], suggérant une meilleure libération intracellulaire de leur « cargaison » [81]. D'autres études montrent qu'un meilleur compromis entre la capacité à condenser, transporter, et libérer l'ADNp était atteint avec des chitosans de poids moléculaires intermédiaires (compris entre 30 et 100 kDa) [106,110,112]. Cependant, leur utilisation dans les processus de transfert de gène est largement limitée par leur insolubilité au pH physiologique ainsi que par leur faible efficacité de transfection [113,114]. Dans le but de surmonter ces limitations, la structure de base du chitosan peut aisément être modifiée ou combinée à d'autres vecteurs. Par exemple, l'ajout de chaîne de polyéthylène glycol (PEG) ou d'autres modifications de nature hydrophile augmentent la solubilité des complexes au pH physiologique et améliore la libération intracellulaire de l'ADNp [105,115]. Plus récemment, Dr. Liu et ses collaborateurs ont synthétisés un chitosan-N-octyl-quaternaire combiné au polyéthylèneimine (OTMCS-PEI) arborant une meilleure efficacité de transfection *in vitro* et *in vivo* en comparaison au polyéthylèneimine (25 kDa) [116].

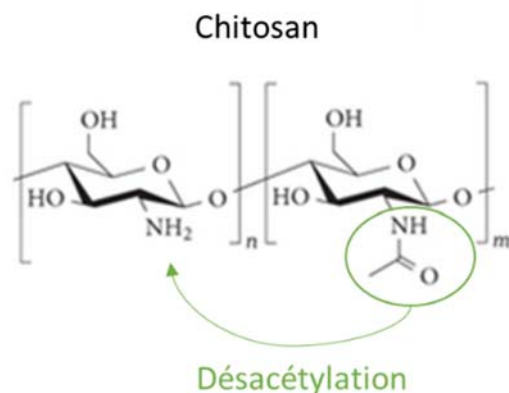


Figure 10 : Structure chimique du chitosan.

## Le Polyéthylèneimine

### Synthèse et Structure du Polyéthylèneimine

Initialement connue pour ses applications dans l'industrie du papier et en chromatographie, le polyéthylèneimine (PEI) fut utilisé avec succès pour le transfert de gène (*in vitro* et *in vivo*) en

1995 [117]. Le PEI existe sous deux formes (figure 11), linéaire (LPEI) ou branchée (BPEI) en fonction de son mode de polymérisation et est décliné en une série de poids moléculaires variables en fonction de son degré de polymérisation (polydisperse) [118]. Le BPEI est synthétisé par catalyse acide et ouverture du cycle de l'aziridine (figure 11) permettant une polymérisation multidirectionnelle des chaînes [119]. En revanche, le LPEI est synthétisé en deux étapes avec, premièrement, une polymérisation par ouverture du cycle de la 2-éthyl-2-oxazoline (figure 11) aboutissant à la formation d'un PEI substitué de groupements N-propionyl (PEOZ), qui sont ensuite éliminés partiellement par hydrolyse acide [119,120]. La structure chimique du PEI incorpore donc une fonction amine tous les trois atomes lui conférant une haute densité de charges positives. Alors que le LPEI possède majoritairement des amines secondaires, le BPEI contient des amines primaires (25 %), secondaires (50%) et tertiaires (25%). La présence de ces atomes d'azote (N) protonés au pH physiologique permet des interactions électrostatiques avec les groupements phosphates (P) de l'ADNp.

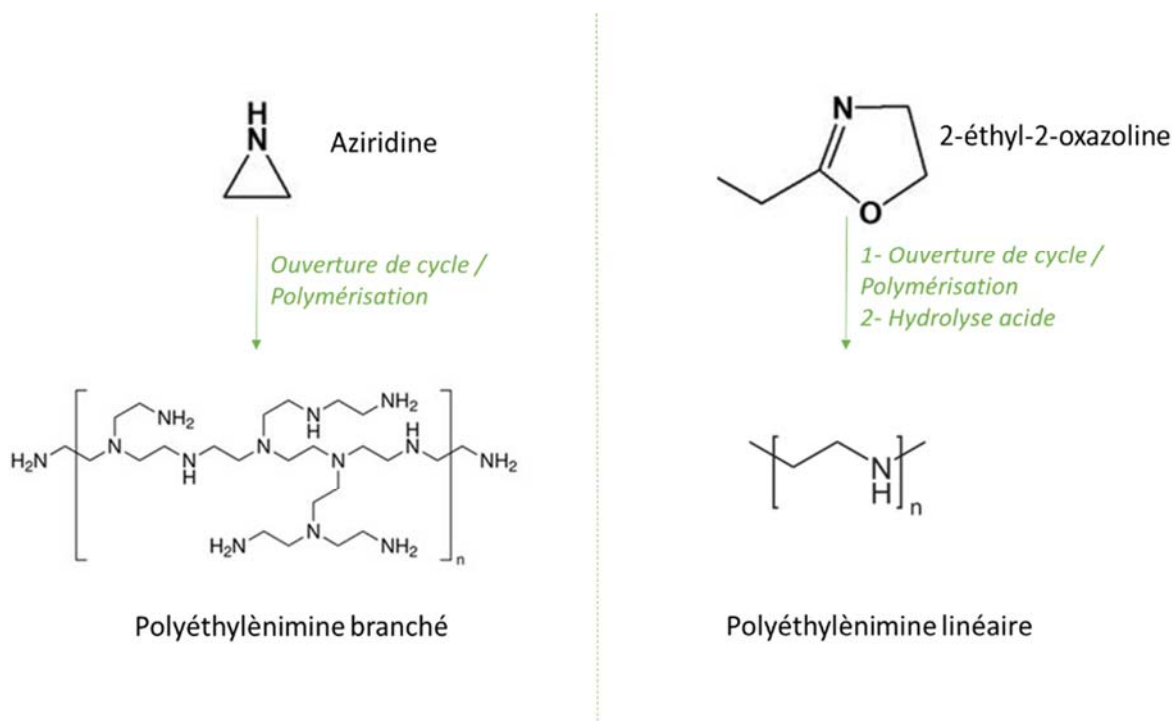


Figure 11 : Structures chimiques de l'aziridine, 2-éthyl-2-oxazoline, polyéthylènimine branché et linéaire.



De par sa structure chimique, le PEI est donc capable de lier l'ADNp de manière non spécifique et de le condenser efficacement, réduisant considérablement son volume en solution [121]. Les complexes PEI - ADNp ainsi formés sont nommés polyplexes [58]. D'autre part, les atomes d'azote non protonés au pH physiologique (80 %) assurent un pouvoir tampon bénéfique durant le trafic intracellulaire des polyplexes [122,123]. En effet, cette propriété dite d' « éponge à protons » (page 36), bien que controversée, permettrait de retarder l'acidification des endosomes provoquant leur rupture et libérant ainsi les polyplexes dans le cytoplasme des cellules [124,125]. L'efficacité de ce vecteur augmente proportionnellement avec son poids moléculaire et son degrés de branchement qui en contrepartie engendre une forte cytotoxicité [126–128]. Le pouvoir transfectant du PEI résultant d'un équilibre entre efficacité et cytotoxicité, le poids moléculaire optimal pour la formation des polyplexes se situe entre 22 et 25 kDa [16,128,129].

#### Les Modifications Chimiques du Polyéthylèneimine

Plusieurs modifications chimiques ont été apportées au PEI afin d'améliorer son efficacité de transfection, diminuer sa cytotoxicité ou encore permettre un ciblage cellulaire [130–135]. De plus, d'autres systèmes nanoparticulaires à base de PEI ont été développés et cherchent à utiliser l'effet synergique entre le pouvoir « transfectant » de ce dernier combiné à la performance d'autres composants : systèmes de micelles polymériques, systèmes nanoparticulaires PEI-métal, systèmes nanoparticulaires PEI-silice, et les systèmes polymériques [130,136].

La déacylation est sans doute la modification chimique la plus commune appliquée au LPEI. En effet, la structure du LPEI peut contenir un nombre considérable de groupements N-propionyl résultant d'une hydrolyse acide incomplète (figure 12). La présence de ces groupements réduirait le nombre de résidus d'azotes protonables limitant ainsi la capacité de condensation de l'ADNp et l'efficacité de l'échappement endosomal des polyplexes [133]. Cette hypothèse a été validée dix ans après la première utilisation du PEI comme vecteur de transfert de gène. En effet, Mini Thomas et ses collaborateurs démontrent que la déacylation complète du LPEI (25 kDa) augmente considérablement son efficacité de transfection [119]. Aujourd'hui les PEI entièrement déacylés sont commercialisés sous le nom de PEI « Max » (Polysciences) et PEIpro™ (Polyplus Transfection). Cependant, l'impact du niveau d'acylation du PEI sur son efficacité a révélé des résultats contradictoires. Alors que certaines études démontrent une

augmentation d'efficacité suite à l'hydrolyse complète du PEI [119,120], d'autres obtiennent une meilleure expression du transgène avec des PEI partiellement hydrolysés [137–139].

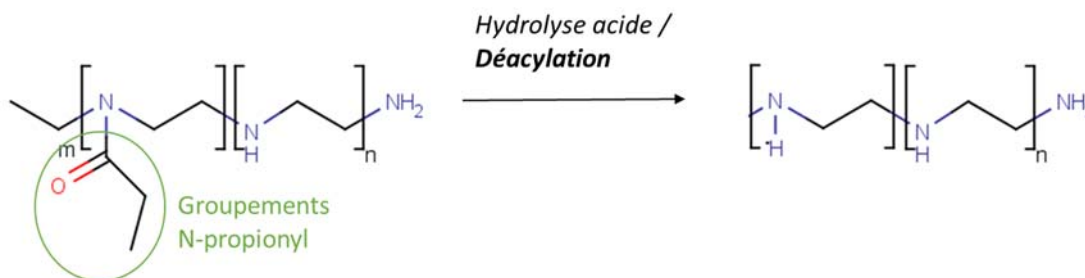


Figure 12 : Déacylation du polyéthylèneimine linéaire.

Lorsque le PEI est employé pour des applications *in vivo*, l'ajout de chaînes de polyéthylène glycol (PEG) est probablement la modification chimique la plus utilisée. En créant une enveloppe extérieure hydrophile, elle limite les interactions des polyplexes avec les protéines plasmatiques et autres composants sanguins. De ce fait, le temps de circulation sanguine des polyplexes est augmenté et leur toxicité diminuée. En contrepartie, cette addition réduit la charge globale de surface des polyplexes qui entraîne une diminution des interactions avec la surface cellulaire et par conséquent leur endocytose [127,140,141]. *In vivo*, la fonctionnalisation des copolymères PEI-PEG est alors nécessaire afin d'éviter aux polyplexes de rester en circulation. Ainsi des motifs peptidiques peuvent être ajoutés dans le but de cibler un type cellulaire en particulier. Par exemple les motifs peptidiques Arginine – Glycine – Aspartate (RGD) permettent de cibler les récepteurs aux intégrines présents à la surface des cellules endothéliales [142].

#### Caractéristiques Physico-Chimiques des Polyplexes

L'ajout de PEI à une préparation d'ADNp en solution aboutit à la formation de polyplexes qui peuvent adopter une structure sphérique, globulaire ou en forme de bâtonnets [143]. La formation de polyplexes qui vont efficacement « transfecter » les cellules est une subtile alchimie entre différents paramètres tel que la structure du PEI, sa capacité de condensation de

l'ADNp, la composition du milieu, le temps d'incubation du mélange et le ratio N/P (azote = nitrogène/phosphate). Premièrement, la structure et la capacité de condensation du PEI influencent le diamètre des polyplexes. En générale, plus le polymère est long ou branché, plus sa densité de charge positive est importante au pH physiologique ce qui améliore sa capacité de condensation de l'ADNp [121] et aboutit à la formation de polyplexes de plus petites tailles. Par exemple, dans une solution saline physiologique, le LPEI 22kDa peut former des polyplexes d'un diamètre supérieur à 1000 nm alors que les polyplexes à base de BPEI 25kDa atteignent un diamètre d'environ une centaine de nanomètre [144]. Plusieurs études ont démontré que des nanoparticules de plus grande taille et donc moins condensées seraient plus efficaces pour le transfert de gène *in vitro* [145]. Notons que l'ordre dans lequel sont ajoutés les composants influence également leurs tailles et leurs formes (addition de PEI dans une solution d'ADNp ou *vice versa*) [121,146]. Une variation de la taille des polyplexes en fonction du temps et de la composition du milieu a été observée dans de nombreuses études. Dans une solution contenant 10 mM de chlorure de sodium (NaCl), les polyplexes à base de LPEI 25 kDa présentent un diamètre supérieur à 500 nm après 30 minutes d'incubation, alors que ce dernier est supérieur à 900 nm lorsque les polyplexes sont formés dans une solution contenant 150 mM NaCl [140]. Un accroissement de la taille des polyplexes (à base de LPEI 25kDa formés dans une solution saline tamponnée d'Hépès) de 120 à 370 nm a été observé sur une période de temps de trois heures. En revanche, les polyplexes à base de LPEI 22kDa ont tendance à agréger plus rapidement, atteignant un diamètre d'environ 750 nm après vingt minutes et dépassant six  $\mu$ m après trois heures [145]. Il a été observé qu'un diamètre compris entre 60 et 400 nm était compatible avec une endocytose efficace des polyplexes *in vivo* [147] et *in vitro* dans les cellules de mammifères CHO et HEK293 [53]. De plus, une charge positive globale des polyplexes est essentiel à une transfection efficace, ce paramètre étant défini par le ratio N/P ou N est excédentaire.

#### Le Polyéthylèneimine à l'État Libre

En présence d'un excès de PEI dans le milieu de complexation, une large fraction du polymère est présente à l'état libre, i.e. non lié à l'ADNp. Il est possible de quantifier le PEI sous forme libre dans le milieu de complexation grâce à la spectroscopie de corrélation de fluorescence, qui est une technique d'imagerie basée sur la mesure de l'intensité de fluorescence et l'analyse de

ses fluctuations. Ainsi il a été mis en évidence que les complexes ADNp - BPEI 25 kDa (préalablement marqués à la rhodamine) à un ratio N/P optimal pour la transfection exhibaient 86 % de PEI sous forme libre [147]. Lorsque les polyplexes à base de L et BPEI (25kDa) sont purifiés par chromatographie par exclusion de taille (SEC) permettant l'élimination du PEI libre, l'efficacité de transfection est significativement réduite *in vitro* et *in vivo* excepté lorsque les polyplexes ont été formés en présence d'une haute concentration d'ADNp [148]. De manière similaire, la transfection des cellules en absence de PEI libre diminue la quantité de polyplexes endocytosés et par conséquent l'efficacité de transfection [149]. Ainsi l'ajout de PEI libre à des cellules en culture préalablement transfectées avec des polyplexes purifiés ou formés sans excès de PEI améliore considérablement l'efficacité de transfection [148]. Plusieurs études mécanistiques révèlent donc que la présence de PEI libre joue un rôle fondamental dans le processus de transfection en facilitant l'entrée des polyplexes dans la cellule et influençant leur trafic intracellulaire [122,148,150,151]. Par contre, le fait que chaque type cellulaire soit efficacement transfectable avec un ratio N/P distinct et donc une quantité de PEI libre variable complexifie la compréhension du rôle exacte du PEI libre dans le mécanisme de transfection [53]. De plus la présence de PEI à l'état libre implique un effet cytotoxique dépendant de sa concentration [148]. L'efficacité d'une transfection est donc le résultat d'un équilibre délicat entre la quantité d'ADNp et de PEI.

#### La Cytotoxicité du Polyéthylèneimine

Bien que l'abondance d'articles scientifiques mentionnant la cytotoxicité du PEI est frappante, les mécanismes moléculaires sous-jacents à cet effet toxique sont très peu documentés. En 2001, Godbey et ses collaborateurs [152] montrent que la mort cellulaire induite par la transfection au BPEI (25 kDa) surviendrait en deux temps. La première phase est caractérisée par un changement morphologique deux heures suivant la transfection. Puis la seconde phase survient entre sept et neuf heures après la transfection et est caractérisée par l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress : l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA), l'inhibiteur-1 des activateurs du plasminogène (PAI-1) et le facteur *von Willebrand* (vWF). En 2010, Beyerle et ses collaborateurs [153] observent également que la transfection au BPEI (25 kDa) induit, six heures après, l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans le stress oxydatif et l'inflammation. Moghimi et ses collaborateurs [154]

montrent en 2005 que le BPEI (25 kDa) et le LPEI (750 kDa) induisent une cytotoxicité en deux phases dont la première survient rapidement après la transfection (30 min) et implique un mécanisme similaire à la nécrose provoquée par l'augmentation de la perméabilité cellulaire. La seconde phase (24 heures suivant la transfection) engage une apoptose conjointe à l'augmentation de l'activité de la caspase-3 et la perte du potentiel de membrane mitochondriale. Ces observations poussent les auteurs à conclure que l'apoptose serait induite par les mitochondries. Plus récemment, le groupe de Theresa Reineke [155] a montré que la transfection au LPEI (25kDa) induit une augmentation de l'activité de la caspase-9 et une dépolarisation de la membrane mitochondriale dans l'heure qui suit la transfection. La colocalisation des mitochondries et du LPEI suggère que ce dernier initierait l'activation de la caspase-9 par une interaction directe avec les mitochondries menant ultimement à la mort cellulaire par apoptose.

#### Conclusion

Il est relativement difficile de comparer l'efficacité des vecteurs synthétiques entre eux, les études de transfection étant rarement réalisées dans des conditions identiques. De manière générale, la capacité d'un vecteur à transférer efficacement du matériel génétique dans les cellules de mammifères est déterminée grâce à l'emploi d'un gène rapporteur. Ce dernier peut coder pour différentes protéines comme par exemple la luciférase, la  $\beta$ -galactosidase, la phosphatase alcaline sécrétée (SEAP) ou encore des protéines fluorescentes (le plus souvent la protéine fluorescente verte ou GFP) dont l'expression est facilement mesurable. Cependant, ces différents systèmes ne permettent pas d'obtenir le même niveau d'information. En effet, alors que la GFP permet d'évaluer le pourcentage de cellules transfectées efficacement, les autres systèmes de détection informent sur le niveau d'expression moyen des cellules transfectées au sein de la culture. La diversité des systèmes rapporteurs limite donc aussi la comparaison des nombreuses études de transfert de gène. D'autre part, il n'est pas aisé d'extrapoler les résultats de transfection d'une lignée cellulaire à l'autre [156] et encore moins dans le cadre d'une évaluation *in vivo* [157]. Néanmoins, *in vivo* le PEI est probablement une des alternatives les plus prometteuses aux vecteurs de transfection viraux [158]. L'efficacité du PEI (*in vitro* et *in vivo* [117,159]), combinée à sa simplicité d'utilisation, son faible coût et sa stabilité en solution en font un vecteur de choix pour la production de r-protéines à grande échelle.

## Les Obstacles du Transfert de Gène

L'organisation compartimentée de la cellule eucaryote représente une barrière au transfert efficace d'un gène et au cheminement de celui-ci jusqu'au noyau cellulaire. De manière générale un vecteur doit délivrer le gène à sa cible : le noyau cellulaire, en contournant plusieurs étapes limitantes : (1) la formation des complexes ADNp - vecteur, (2) l'attachement à la membrane cellulaire, (3) l'entrée dans la cellule, (4) la libération des complexes à proximité du noyau cellulaire, (5 ?) la dissociation des complexes et (6) l'entrée de l'ADNp dans le noyau [129,160,161]. Afin d'aider à la compréhension des mécanismes intracellulaires sous-jacent au transfert de gène, cette partie documente les différents réseaux membranaires de la cellule de mammifères (ou obstacles à la technique du transfert de gène schématisés figure 13) que doivent traverser les polyplexes et discute les mécanismes biologiques décrits dans la littérature permettant aux polyplexes à base de polyéthylèneimine de franchir ces étapes.

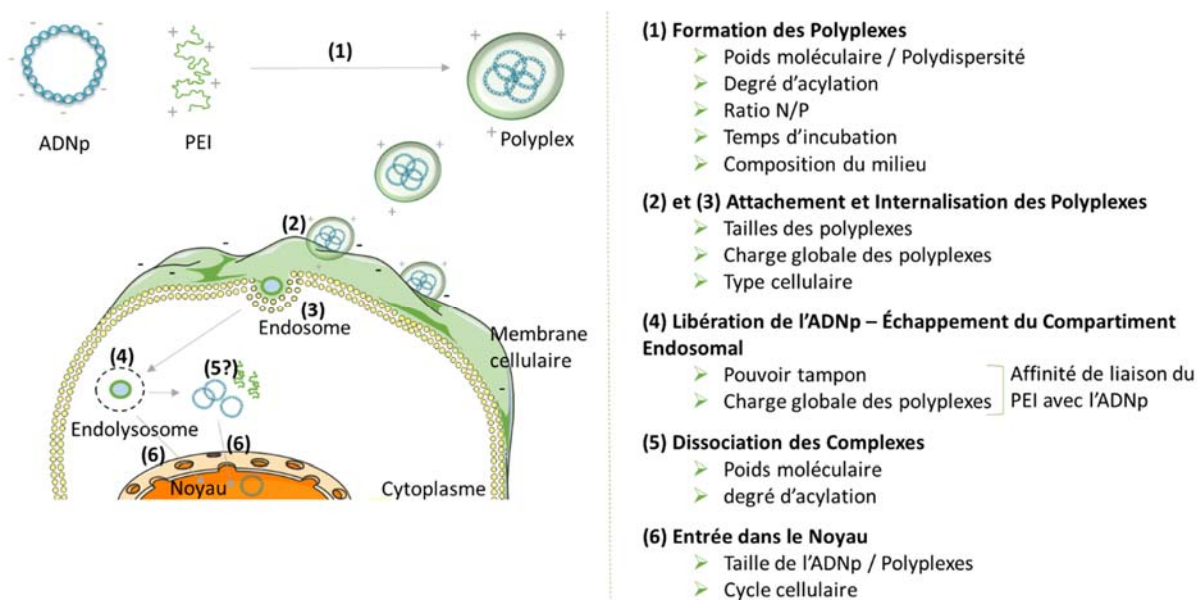


Figure 13 : Représentation schématique des étapes du transfert de gène par le polyéthylèneimine et paramètres à considérer.

## L'Entrée dans la Cellule

*In vitro*, la membrane plasmique est le premier obstacle que doivent traverser les polyplexes. Elle est composée de lipides membranaires qui s'organisent en micro domaines mobiles dans le plan de la membrane, conformément au modèle de « mosaïque de fluides » décrit en 1972 [162]. Cette fluidité permet l'internalisation de diverses particules présentes dans le milieu environnant par un mécanisme d'endocytose qui est indispensable à la survie cellulaire.

### Les Voies d'Endocytose

On distingue plusieurs voies d'endocytose dont la macropinocytose, la voie dépendante de la clathrine et les voies indépendantes de la clathrine (figure 14). D'un point de vue physiologique, l'existence de plusieurs voies d'endocytose n'est pas entièrement comprise mais on pense que les différentes voies d'entrée dans la cellule aboutiraient à des destinations intracellulaires distinctes.

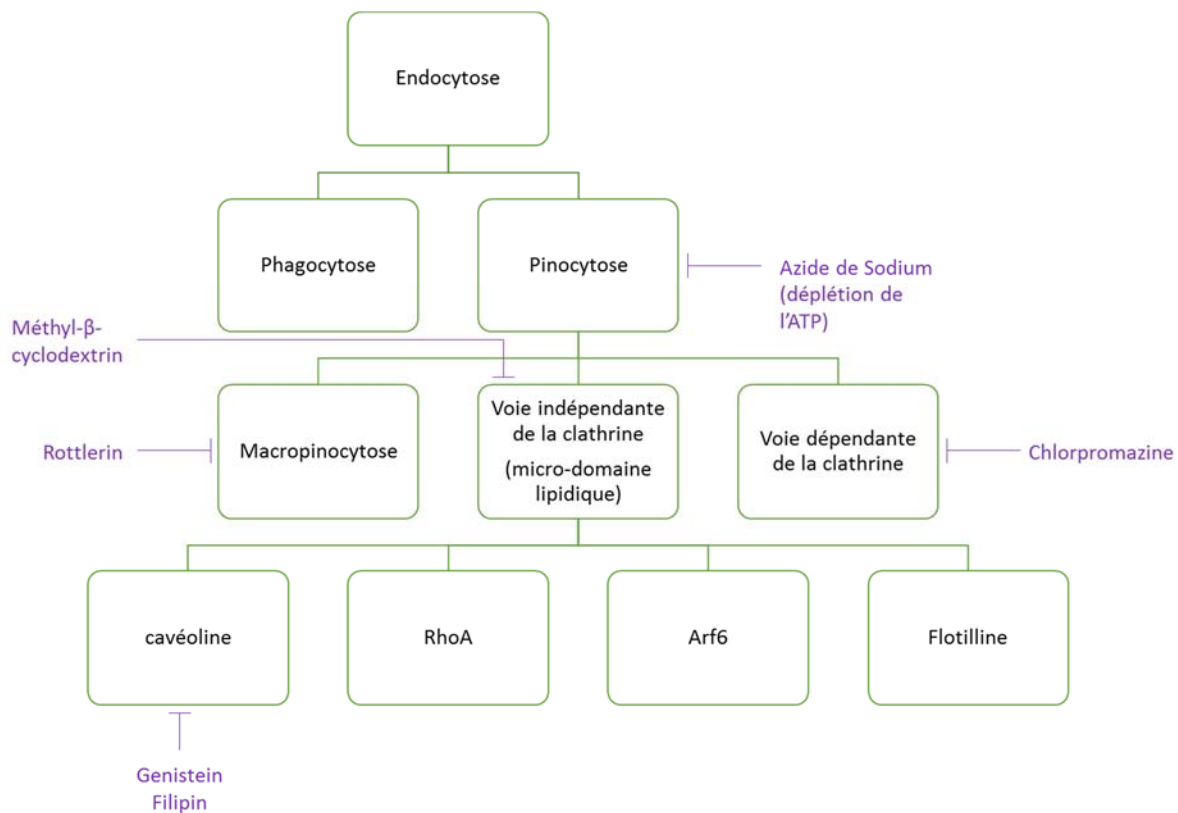


Figure 14 : Classification des voies d'endocytose et leurs inhibiteurs les plus couramment utilisés.

La **voie d'endocytose dépendante de la clathrine** est la mieux caractérisée car sa découverte remonte au début des années 1960. Suite à la reconnaissance d'un ligand par un récepteur présent à la membrane cellulaire, les complexes ligand - récepteur sont internalisés grâce à la formation de puits « mantelés ». Le manteau des vésicules ainsi obtenues est principalement constitué de la protéine structurale clathrine [163]. Cette dernière est constituée de trois chaînes lourdes associées à trois chaînes légères formant des « triskèles » de clathrine observés en microscopie électronique en 1981 [164]. Ces « triskèles » ont la capacité de s'auto-assembler (intervention d'un complexe adaptateur AP-2 [165]) permettant la déformation d'une partie de la membrane plasmique pour former des vésicules (~ 100 nm) recouverte d'un manteau de clathrine [166]. La fission membranaire aboutissant à la formation de la vésicule est induite par phosphorylation de la dynamine, une GTPase indispensable à ce mécanisme [167]. Une fois internalisées les vésicules sont débarrassées de leur manteau de clathrine et fusionnent avec les endosomes de triage dits « précoces ». Les molécules sont ensuite transférées dans les endosomes secondaires ou « tardifs », puis dans les lysosomes dans un intervalle de 40 à 60 minutes [168]. Ce mécanisme est corrélé à l'acidification de l'intérieur des vésicules allant d'un pH de 6.5 - 6.8 pour les endosomes à un pH de 4.5 pour les lysosomes [169]. Les molécules internalisées par la voie dépendante de la clathrine sont le plus souvent dirigées dans la voie de recyclage vers la membrane plasmique (LDL par exemple) ou dans la voie de dégradation lysosomale (facteurs de croissance par exemple) [170].

Les **voies d'endocytoses indépendantes de la clathrine** ont été caractérisées grâce aux études de mutants dominants négatifs de la clathrine et à l'amélioration de la performance des outils et des méthodes de visualisation microscopique permettant de suivre l'endocytose de protéines fluorescentes. Les micro-domaines lipidiques ou « radeaux » sont enrichis en lipide de type cholestérol et sphingolipide. Cette composition lipidique caractéristique des micro-domaines les rend résistants à l'action de détergents anioniques à 4°C permettant de les isoler. L'étude de la composition protéique des micro-domaines est ainsi possible et montre une abondance de protéines à ancrage glycosyl phosphatidyl inositol (GPI) [171,172] suggérant un rôle essentiel dans la signalisation cellulaire en permettant la concentration des glycoprotéines et d'autres récepteurs (tel que ceux de l'insuline et l'interleukine-2 [173]). Les micro-domaines mesurent environ 70 nm et représentent entre 10 et 30 pourcents de la surface cellulaire. Plusieurs types



d'endocytose ont lieu au niveau des micro-domaines lipidiques : l'endocytose médiée par la cavéoline, les flotillines, GRAF1, Arf6 et RhoA [174] (dont seulement les deux premières seront abordées dans ce paragraphe). Dans la voie d'endocytose dépendante de la cavéoline, le manteau de clathrine est remplacé par un réseau de cavéoline donnant naissance à une vésicule appelée cavéole (60 - 80 nm) dont la forme particulière en oméga a permis son identification en microscopie électronique (Georges Palade en 1953). Les cavéoles ont la capacité de fusionner entre elles pour former un cavéosome qui permettrait de contourner la voie lysosomale pour transférer son contenu au réticulum endoplasmique [175]. Cependant, on sait aujourd'hui que la destination du contenu et l'enchaînement d'évènements propre à l'endocytose médiée par la cavéoline dépend du type cellulaire [174]. Les flotillines (FLOT-1 et FLOT-2) sont des protéines présentes à la membrane cellulaire impliquées entre autres dans l'endocytose de ligands. L'hétérogénéité de leur localisation cellulaire, l'absence de séquences caractéristiques et le manque de connaissance des protéines interagissant avec la flotilline sont des limitations à la compréhension de leur fonction cellulaire [176]. On sait néanmoins que la voie d'endocytose impliquant les flotillines est indépendante de la clathrine et de la cavéoline [177,178]. Elle est impliquée dans l'internalisation de ligands spécifiques [179], de la toxine cholérique [180] et également l'entrée de polyplexes à base de polyamidoamine (dendrimères) [178].

Enfin, la **macropinocytose** est une voie d'endocytose qui correspond à la formation de vésicule de grande taille par évagination de la membrane cellulaire appelée macropinosome. Leur diamètre varie de 0.5 à 5 µm et leur progression endocytotique permet leur fusion avec les lysosomes où leur contenu est généralement dégradé. De nombreux pathogènes profitent de cette voie d'entrée non spécifique afin d'infecter les cellules, citons comme exemple le virus Ebola [181] (tristement populaire en 2014).

### *L'Endocytose des Polyplexes*

Suite à l'attachement des polyplexes à la surface de la cellule (mécanisme décrit en détail à la page 51), ces derniers sont internalisés principalement par endocytose en raison de leur petite taille [121]. Une endocytose constitutive permet le renouvellement de la membrane plasmique dont le temps de demi-vie est estimé à environ 10 minutes pour les cellules CHO [182]. Cependant, les polyplexes sont capables d'induire activement leur endocytose et ne sont pas

simplement transportés [183]. L'accumulation des données concernant l'internalisation des polyplexes permet de conclure que la voie d'endocytose empruntée par ces derniers dépend de la lignée cellulaire et du type de PEI (branchée ou linéaire) [156]. Par exemple Von Gersdorff et ses collaborateurs [184] ont montré que dans les cellules de rein de grivet d'Afrique (COS-7) et les cellules d'un carcinome hépatocellulaire aviaire (HUH-7) l'endocytose médiée par la clathrine est la voie empruntée par les polyplexes à base de LPEI. D'autre part, les cellules HUH-7 sont plus efficacement transfectées par les polyplexes à base de LPEI (40 % des cellules exprimant le transgène EGFP) en comparaison à ceux formés avec du BPEI (22 % des cellules). Ceci suggère que les voies empruntées par les deux types de polyplexes sont distinctes. Dans les cellules HeLa, les polyplexes à base de BPEI sont majoritairement internalisés par une endocytose faisant intervenir les radeaux lipidiques et moins par celle médiée par la clathrine bien que l'efficacité de transfection résultante est similaire (25%) [184]. Dans les cellules A549, alors que les polyplexes internalisés par endocytose dépendante de la clathrine sont dégradés dans les lysosomes, ceux endocytosés via la voie dépendante de la cavéoline permettent une transfection efficace des cellules [185]. En accord avec ces résultats, l'inhibition de la voie d'endocytose dépendante de la cavéoline cause une réduction significative de l'expression du transgène médiée par le LPEI dans les cellules COS-7 [186], de même que dans les cellules CHO-K1 et HeLa [187]. Dans les cellules HEK293, les polyplexes à base de BPEI sont principalement internalisés par les radeaux lipidiques bien qu'il semble que cette voie conduise à l'agrégation cytoplasmique des polyplexes (voir le chapitre 3). En conclusion, ces études indiquent que les polyplexes peuvent être endocytosés par différents mécanismes. De plus, ces voies d'endocytose ne s'excluent pas mutuellement et permettent l'entrée des polyplexes simultanément dans la cellule. Dans le but de comprendre les liens existant entre les diverses voies d'endocytose, des études ont montré que la voie médiée par la cavéoline se confond au niveau des endosomes avec celle médiée par la clathrine [188,189]. De plus, notons que ces études se basent généralement sur l'utilisation d'inhibiteurs (dont les plus courants sont énumérés à la figure 14) bloquant une voie d'endocytose en particulier. Toutefois, aucun n'est absolument spécifique et tous affectent l'organisation du cytosquelette d'actine impliquant des effets secondaires. Il est aussi probable que l'usage d'un inhibiteur affecte d'autres voies d'endocytose que celle ciblée car elles sont possiblement toutes interconnectées [190].

## La sortie des Endosomes

Le manque d'efficacité des vecteurs synthétiques en comparaison aux vecteurs viraux est probablement lié à leur dégradation au niveau lysosomal. Alors que les vecteurs viraux ont développé des mécanismes « naturellement efficaces » permettant leurs sorties des endosomes, les vecteurs synthétiques doivent contourner cette étape limitante en mettant en place des stratégies empêchant ou limitant la maturation endosomale.

En 1998, Hélène Pollard et ses collaborateurs [191] proposent un lien causal entre le pouvoir tampon du PEI et son efficacité dans le transfert de gène. Ce pouvoir tampon, appelé « éponge à protons » (figure 15), permet aux polyplexes d'empêcher l'acidification des endosomes retardant l'action des nucléases lysosomales qui ne sont effectives qu'à pH acide.

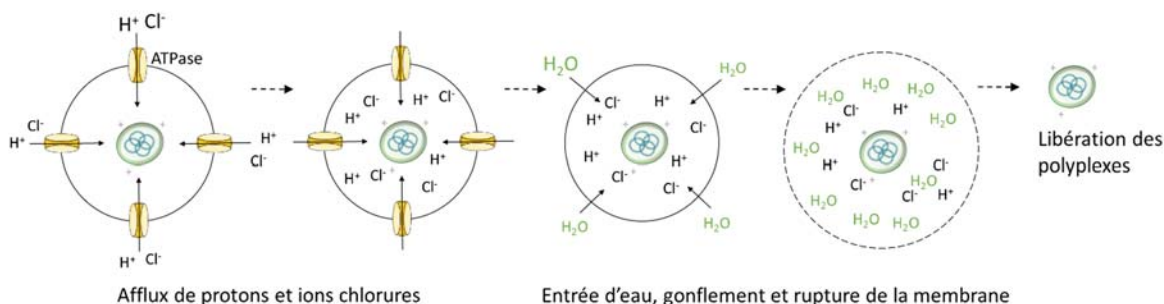


Figure 15 : Mécanisme schématisé du phénomène d'éponge à protons adaptée de Mireia Agirre et al. [192].

La structure du PEI comporte un azote tous les trois atomes dont la majorité (80 %) n'est pas protonée au pH physiologique [123]. L'acidification des endosomes à un pH 5 provoque la protonation de 45 % des atomes d'azote du PEI [123] entraînant une arrivée massive de protons couplée à celle d'ions chlorures [193,194]. Afin de compenser l'augmentation de la concentration ionique des endosomes contenant les polyplexes, une entrée conséquente d'eau est observée par simple phénomène osmotique, ce qui induit leur gonflement, puis leur rupture. La présence d'inhibiteurs de la pompe à protons (tel que la bafilomycine A1 et la concanamycine) dans le milieu de culture inhibe l'expression du transgène validant ainsi

l'hypothèse de l'« éponge à protons » [195]. De plus, le remplacement des amines protonables par des amines quaternaires (non protonables) dans la structure du PEI réduit de 20 fois l'expression du transgène [133,196] indiquant l'importance du phénomène d'« éponge à protons » dans le mécanisme de transfert de gène par le PEI. Cependant, plusieurs groupes de recherche ont montré que le pH des lysosomes n'est pas modifié suite à l'entrée des polyplexes dans la cellule. Ceci leur permet de conclure que le phénomène d'« éponge à protons » est incorrect ou ne serait pas le mécanisme dominant de l'échappement endosomal des polyplexes [197,198].

### **Le Trafic Intracytoplasmique et l'Entrée dans le Noyau**

Les mécanismes du routage intracellulaire et de l'entrée des polyplexes ou de l'ADNp dans le noyau sont mal connus. On estime qu'entre 2 000 et 100 000 copies plasmidiques peuvent être délivrées à l'intérieur de chaque cellule [199] mais seulement 1 à 10 % atteignent le noyau cellulaire [200]. L'étude pionnière de Hélène Pollard et ses collaborateurs en 1998 [191] montre que la microinjection des polyplexes PEI - ADNp directement dans le cytoplasme de la cellule augmente significativement l'expression du transgène. Plusieurs interprétations découlent de ce résultat notamment la capacité du PEI à faciliter l'importation nucléaire de sa cargaison, ou indirectement le PEI permettrait la protection de l'ADNp contre l'action des nucléases dans le cytoplasme et une meilleure diffusion dans cet environnement visqueux. Les polyplexes seraient en effet capables d'utiliser le cytosquelette de la cellule et ainsi évoluer plus facilement dans le cytoplasme [201]. En 2002, Brunner et ses collaborateurs [202] observent que l'inhibition chimique de la croissance cellulaire résulte en un faible niveau d'expression du transgène et proposent une entrée passive du matériel génétique (complexé ou non) lors de la désorganisation temporaire de la membrane nucléaire pendant la division cellulaire [202,203]. Cette hypothèse est soutenue par le fait que les vecteurs synthétiques sont plus efficaces dans les cellules en division que dans les cellules quiescentes [204]. Toutefois, la transfection efficace des cellules neuronales avec des polyplexes à base de PEI [205] suggère qu'un autre mécanisme pourrait aussi réguler l'importation nucléaire de l'ADNp. La double couche lipidique de l'enveloppe nucléaire peut être traversée lors de sa rupture au moment de la mitose mais aussi au niveau des pores nucléaires. Ce sont de grands complexes protéiques d'environ 125 kDa constitués

d'importines  $\alpha$  et  $\beta$  permettant un transport actif dans leur état conformationnel « ouvert » (molécule  $\leq 26$  nm) ou passif dans leur état conformationnel « fermé » (molécule  $\leq 9$  nm). Une nette amélioration de l'expression du transgène a été obtenue suite à l'attachement de séquences NLS (*nuclear localisation signal*) à la molécule d'ADNp [206]. Ce sont des séquences peptidiques ayant une grande affinité pour les importines qui assurent le transport de macromolécules du cytoplasme vers le noyau. Cependant, la taille des polyplexes à base de PEI ayant généralement un diamètre supérieur à 40 nm [53], il est peu probable qu'ils soient capables d'emprunter cette voie suggérant qu'une dissociation du complexe est nécessaire au passage de l'ADNp par les pores nucléaires.

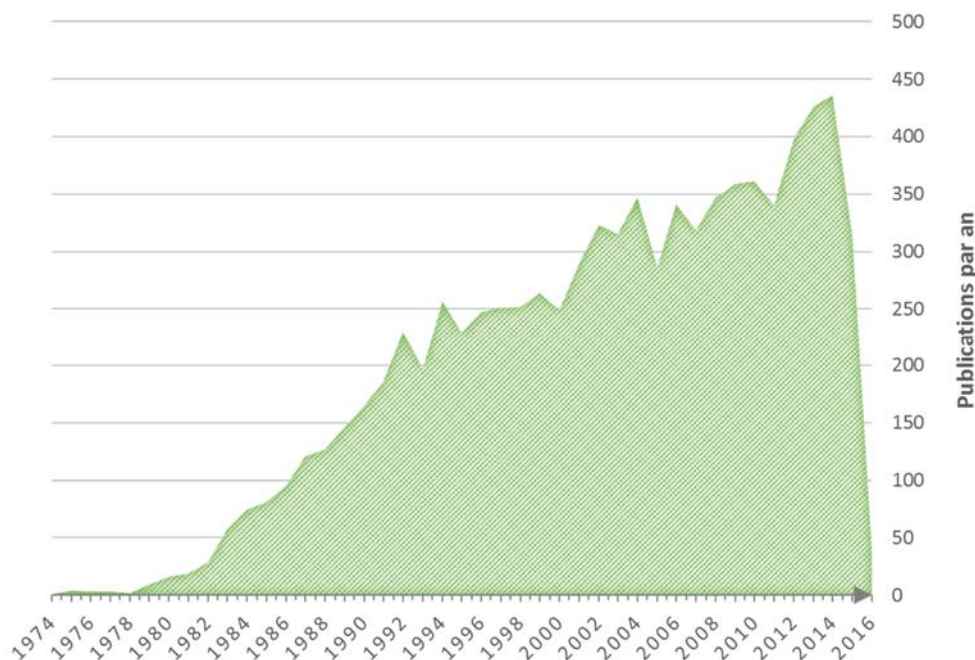
### **La Dissociation des Polyplexes**

La dissociation des polyplexes lors des étapes du transfert de gène est une question encore non résolue. Alors que certaines études tentent d'évaluer la cinétique de dissociation des polyplexes dans le cytoplasme de la cellule [147], d'autres suggèrent que cette dissociation n'est pas une étape indispensable. En effet, plusieurs groupes de chercheurs ont observé la présence de polyplexes dans le noyau cellulaire [124,207,208] et l'ADNp complexé par le PEI serait accessible à la machinerie transcriptionnelle de la cellule [209].

## **Les Protéoglycanes à Héparane Sulfate**

### **Généralités**

La membrane cellulaire est généralement « décorée » par un type particulier de complexes polysaccharide - protéine : les protéoglycanes (PG) membranaires ( $10^5$  à  $10^6$  molécules par cellules [210]). Ces derniers sont formés de plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes (GAG) attachées de manière covalente à une molécule protéique centrale. Les principaux GAGs sont l'héparane sulfate (HS), l'héparine (HP), la chondroïtine sulfate (CS), le dermatane sulfate (DS) et le kératane sulfate (KS). Les protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG) sont exprimés par la plupart des cellules de mammifères et localisés à leur surface. A ce sujet, une recherche dans Pub Med utilisant les termes « *heparan sulfate proteoglycan* » indique 8 548 références en date du 26 février 2016 (figure 16).



*Figure 16 : Publications mentionnant les héparanes sulfates par année depuis 1974.*

*Source : PubMed consulté le 26 février 2016.*

## Structure des Chaînes Polysaccharidiques d'Héparane Sulfate

Les héparanes sulfates sont des glycanes linéaires et non ramifiés composés d'une unité disaccharidique répétée. L'**unité de base** est constituée de deux monosaccharides : un acide uronique (acide D-glucuronique ou L-iduronique) et un hexose simple de type D (glucosamine). Le nombre de disaccharides est très variable d'une chaîne d'héparane sulfate à l'autre, mais il est généralement compris entre 20 et 80 répétitions [210]. Lors de la synthèse des héparanes sulfates, l'unité de base peut être modifiée par épimérisation, acétylation, N- et O-sulfatation, ce qui engendre un grand niveau de complexité (figure 17). En effet, les héparanes sulfates sont structurellement les GAG les plus complexes [211]. On distingue des régions plus ou moins modifiées qui sont distribuées de manière uniforme le long de la chaîne polysaccharidique (figure 17). Le **domaine NS** est composé de 2 à 8 disaccharides N-sulfatés contigus. Plus particulièrement, le disaccharide prépondérant du domaine NS est l'acide iduronique 2-O sulfaté lié en (1-4) au glucosamine N et 6-O sulfaté (IdoA2S-GlcNS6S) [212]. Les domaines NS sont

entourés de régions de transition (**domaine T**) alternant les disaccharides N-sulfatés et N-acétylés [212]. La région de transition T crée ainsi un lien entre le domaine NS et le **domaine NA** (N-acétylée) qui est très peu modifié [212]. L'existence de ces motifs uniques permet aux héparanes sulfates de lier spécifiquement de nombreux ligands [213–216]. Les interactions HS - ligands dépendent donc de la structure variable de la chaîne polysaccharidique qui est principalement déterminée durant sa biosynthèse [217]. Néanmoins, en présence d'endosulfatases (SULF1 et SULF2) localisées à la surface cellulaire et clivant les groupements 6-O sulfates, la structure des HS peut être profondément modifiée modulant ainsi leur propriété de liaison aux ligands [218–220]. La complexité est telle qu'on a vu apparaître la notion d'héparanome [221]. Ce code moléculaire est difficilement déchiffrable en raison du peu de techniques permettant d'étudier les caractéristiques structurales des HS. De plus, l'appréciation de la conformation tridimensionnelle des HS (figure 17) permettrait de mieux comprendre la spécificité de l'interaction avec les ligands [222–224].

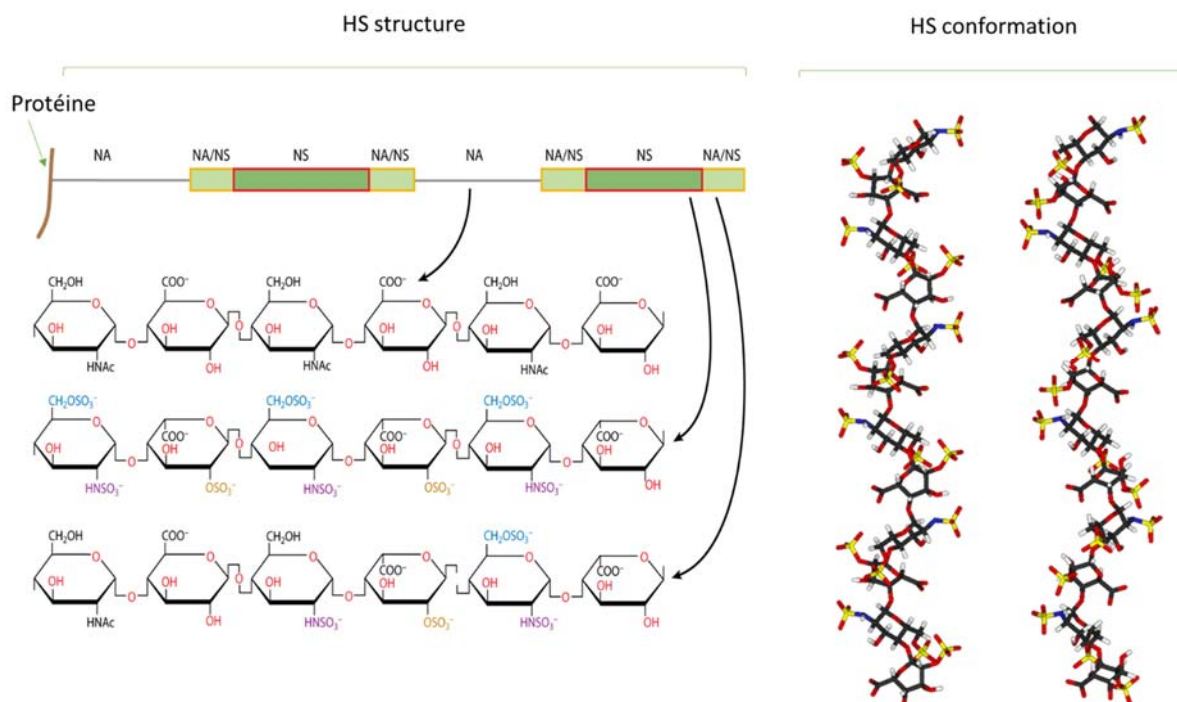


Figure 17 : Structure et conformation des héparanes sulfates.

(A gauche) Représentation des domaines NA, NS et T (NA/NS) de la chaîne polysaccharidique d'héparane sulfate [225]. (A droite) Conformations de la molécule d'héparine (= domaine NS)

*en solution. Les atomes de carbone sont représentés en gris, oxygène en rouge, azote en bleu, et jaune pour les atomes de soufre.*

## **Biosynthèse des Chaînes Polysaccharidiques d'Héparane Sulfate**

In vivo, la synthèse biologique des héparanes sulfates est dépendante du site tissulaire et change durant les phases du développement, l'âge et la maladie [226–230]. Il s'agit d'un processus enzymatique qui a lieu dans le compartiment golgien [231] et peut être divisé en trois étapes majeures : initiation, polymérisation et modification de la chaîne polysaccharidique (figure 18). Durant la phase d'**initiation**, le tétrasaccharide (xylose - galactose - galactose - acide uronique) s'attache à une sérine de la protéine centrale par O-glycosylation. La **polymérisation** du sucre est ensuite initiée par l'addition d'un résidu de glucosamine N-acétylé. Une fois induite, la polymérisation permet l'ajout en alternance des résidus d'acide glucuronique et N-acétyl-glucosamine. La **modification** de la chaîne polysaccharidique par diverses enzymes survient conjointement à la phase de polymérisation. Brièvement, ces enzymes introduisent des groupements sulfates à des positions variables du polysaccharide et quelques résidus d'acide glucuronique sont convertis en acide iduronique par epimérisation. Le produit final a une organisation moléculaire spécifique qui s'agence en une succession de trois domaines distincts plus ou moins modifiés (figure 17).

La première enzyme intervenant dans la phase de modification est une héparane glucosaminyl ou NDST (N-déacétylase / N-sulfotransférase) qui remplace les groupements acétyles par des groupements N-sulfates. Cette enzyme a un rôle clé dans la biosynthèse des HS car les modifications subséquentes prennent place à proximité immédiate des groupements N-sulfatés [232]. Il existe quatre isoformes de l'enzyme NDST identifiées chez les mammifères [233] (transcrites à partir de quatre gènes différents). Ce sont des protéines transmembranaires de type II possédant un domaine cytoplasmique court (12 à 18 acides aminés) et un domaine catalytique contenant deux sites indépendants responsables de la N-déacétylation et la N-sulfatation [233]. Toutefois, on ne sait pas exactement comment les NDST ciblent des régions particulières de la chaîne d'héparane sulfate. Deuxièmement, la conversion consécutive des résidus d'acide glucuronique en acide iduronique par la C5-épimérase est restreinte aux régions N-sulfatées nouvellement formées. De plus, les enzymes C5-épimérase et 2-O-sulfotransférase (2OST) sont



étroitement liées et modifient les régions N-sulfatées contiguës (domaine NS). Les résidus N-acétyl-glucosamine sont les substrats de l'enzyme 6-O-sulfotransférase (6OST) avec la condition particulière qu'ils soient adjacents à un disaccharide N-sulfaté (domaines NS et T). Enfin, les chaînes d'héparanes sulfates peuvent subir l'addition de groupements 3-O-sulfates catalysées par l'enzyme 3-O-sulfotransférase (3OST). Ces enzymes agissent préférentiellement dans les régions fortement N-sulfatées (domaine NS) [227]. A la lumière de ces informations, il apparaît évident que la phase de modification lors de la biosynthèse des HS est une étape déterminante. Sa régulation dépend de l'expression différentielle des enzymes NDST et sulfotransférases qui sont, quant à elles, régulées par des mécanismes encore peu connus. Un contrôle hormonal au niveau cellulaire serait impliqué [234]. En effet, les hépatocytes de rats mis en culture produisent un type particulier de HS composé en majorité de résidus N-acétyl-glucosamine et organisés en bloc. Curieusement, les polysaccharides HS produits dans la fraction microsomale de ces mêmes cellules sont majoritairement N-déacétylés. De plus, la biosynthèse des HS est spécifique d'un tissu à l'autre [227,235] et comprendre la régulation de ce processus est un défi majeur que certains chercheurs tentent d'approfondir [236–238].

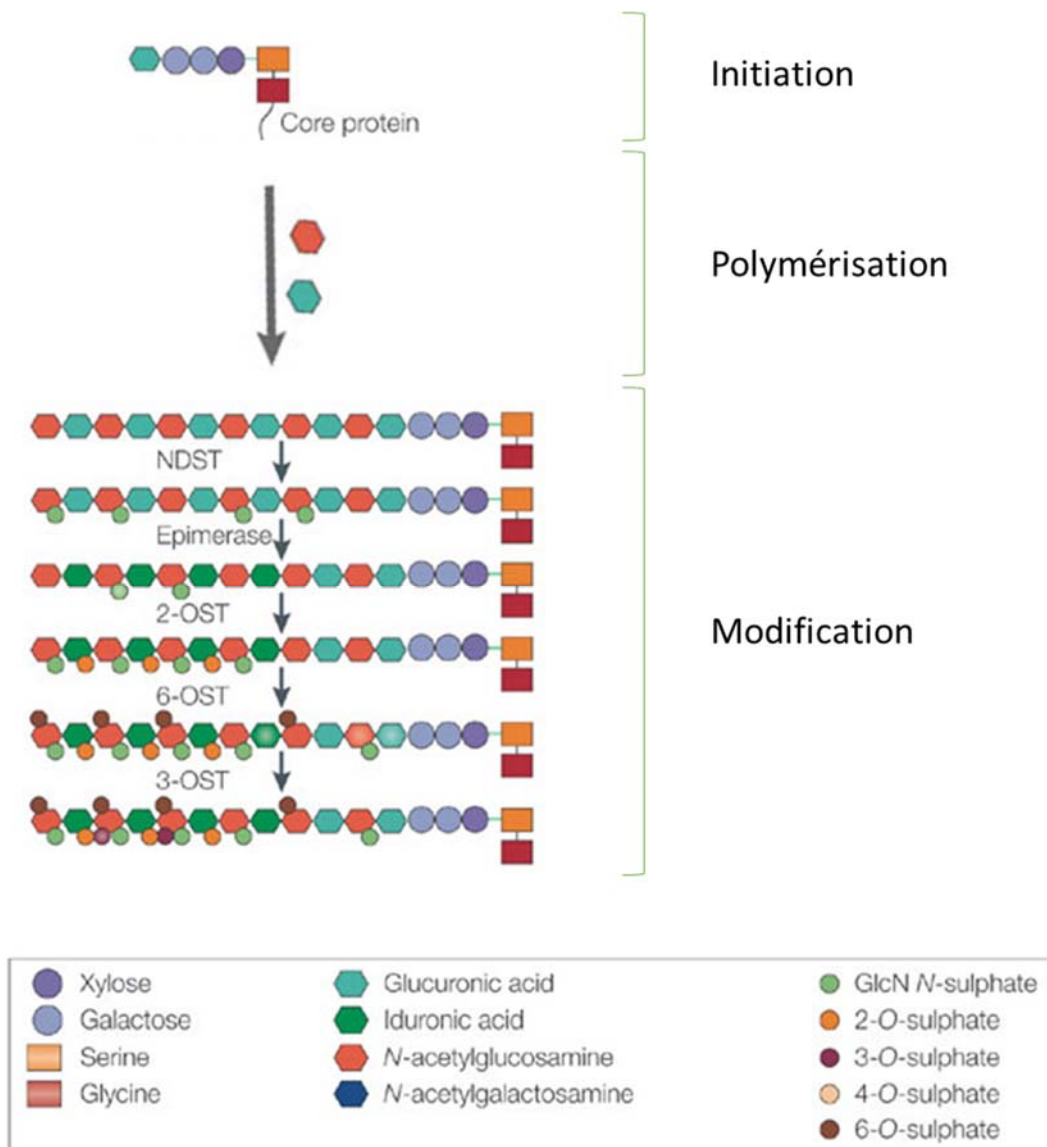


Figure 18 : Biosynthèse des héparanes sulfates (adapté de Hacker et al. [239]). Dans le compartiment cellulaire, les phases d'élongation et de modification ont lieu en parallèle.

# Les Principaux Protéoglycanes à Héparane Sulfate : Glypicanes et Syndécanes

## Généralités

On distingue deux principales familles d'HSPG membranaires : les syndécanes (SDC1-4) et les glypicanes (GPC1-6) qui diffèrent dans leur séquence d'acides aminés et mode d'interaction avec la membrane cellulaire. Alors que le corps protéique des SDC est transmembranaire, celui des GPC est lié à la membrane plasmique par une ancre glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI) [240].

## Les glypicanes

Les glypicanes (figure 19) sont des HSPG liés au feuillet externe de la membrane plasmique par une ancre GPI. La protéine centrale des GPC possède des résidus de cystéines très conservés d'un membre à l'autre formant des ponts disulfures intramoléculaires [241] et ainsi une tête globulaire. Les chaînes d'héparanes sulfates sont généralement associées à la protéine centrale sous la tête globulaire, proche de la membrane plasmique.

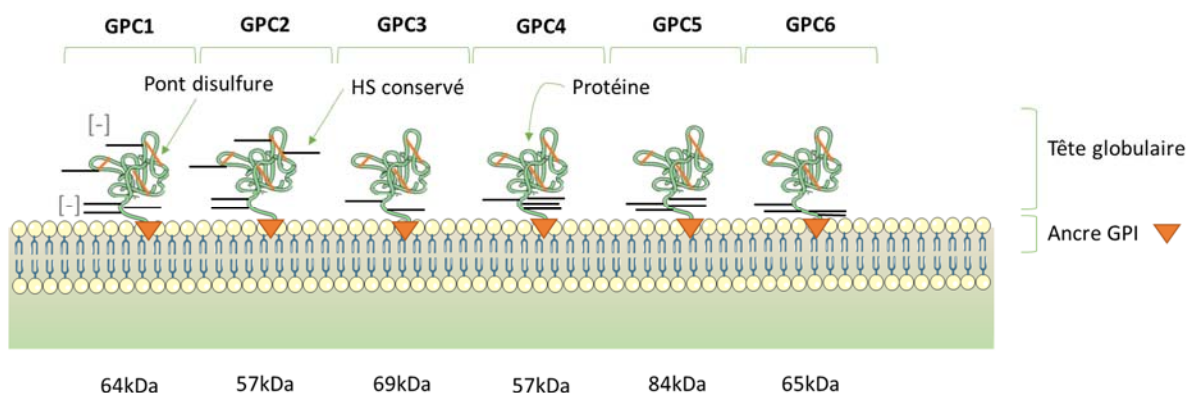


Figure 19 : Représentation schématique des glypicanes.

La séquence d'acide aminé des GPC arbore 25 % d'homologie entre chacun de ses membres et, *in vivo*, ils jouent un rôle important le développement embryonnaire, la morphogenèse et la

croissance en supervisant (en tant que corécepteurs) la mise en place de gradients de morphogènes (Wnt, Hedgehog, BMP : protéines morphogéniques osseuses) et facteurs de croissance (FGF : facteurs de croissance des fibroblastes) [242]. Comme les autres protéines à ancrage GPI, on les trouve généralement à la membrane cellulaire au niveau des micro-domaines (page 33). Néanmoins, les GPC peuvent être clivés par la convertase furine ou la lipase extracellulaire connue sous le nom de *Notum*, se retrouvant ainsi dans le milieu extracellulaire [243,244]. Plusieurs études ont démontré que ce clivage joue un rôle important dans de nombreuses maladies humaines comme le cancer et le transport des morphogènes [245–249]. Les domaines structuraux des GPC impliqués dans ces mécanismes n'ont pas encore été identifiés à ce jour et leur découverte profiterait à la compréhension des relations structures - fonctions cellulaires des glypicanes.

### Les syndécanes

Le nom syndécane dérive du mot latin *syndein* qui signifie « attacher » et a été choisi en raison de leur implication dans la liaison aux protéines de la matrice extracellulaire. Globalement, le SDC1 est principalement exprimé par les cellules épithéliales et mésenchymateuses. Le SDC2 est préférentiellement exprimé par les cellules du foie, neuronales et les fibroblastes. Le SDC3 est présent au niveau des cellules musculaires en développement mais aussi et surtout dans les cellules épithéliales. Enfin, le SDC4 est exprimé de manière ubiquitaire. Les syndécanes (figure 20) sont des récepteurs membranaires de type I [225]. On distingue donc trois domaines : cytoplasmique, transmembranaire et extracellulaire sur lequel on trouve une ou plusieurs chaînes d'héparanes sulfates. Notons que l'ectodomaine de SDC1 et SDC4 peut aussi être porteur d'un autre type de GAG : les chondroïtines sulfate dont le rôle est largement inexploré [250]. Le **domaine extracellulaire** des syndécanes est le plus variable, d'une part en terme de séquence d'acide aminé (aucune homologie [251]) et d'autre part parce qu'il est le siège de nombreuses modifications post-traductionnelles (page 41). De ce fait, l'ectodomaine des syndécanes peut interagir avec une grande variété de ligands tels que des facteurs de croissance, cytokines, composants de la matrice extracellulaire mais aussi des pathogènes. Le **domaine transmembranaire** des SDC est largement conservé (25 acides aminés hydrophobes) et principalement engagé dans l'homo-oligomérisation de la protéine centrale [252]. Le motif

conservé GXXXG (ou X peut être n'importe quel acide aminé) est impliqué dans ce processus d'oligomérisation essentiel à la signalisation des SDC. Une étude très récente a montré que le SDC-2 et SDC-4 étaient capables d'hétéro-oligomérisation réduisant leur activité respective [253]. Le **domaine cytoplasmique** est court et présente deux parties conservées d'un membre à l'autre (C1 et C2) séparés par une région dite « variable » (V). La région C1, adjacente à la membrane plasmique, est impliquée dans l'initiation de la dimérisation des SDC [254] et permet de lier de nombreuses molécules intracellulaires comme par exemple l'actine, la tubuline ou les protéines tyrosine-kinase de la famille Src [255]. Quant à elle, la région C2 présente un térapeptide conservé (EFYA) [256,257] capable de lier des protéines contenant un domaine PDZ. De manière générale, ces protéines agissent comme molécules d'échafaudage induisant le recrutement des protéines du cytosquelette à la membrane plasmique (par exemple la synténine [258], la synectine et la synbindine [259]). Les conditions structurales et biologiques induisant l'interaction des protéines à domaine PDZ avec la région C2 font actuellement l'objet d'intenses recherches [260].

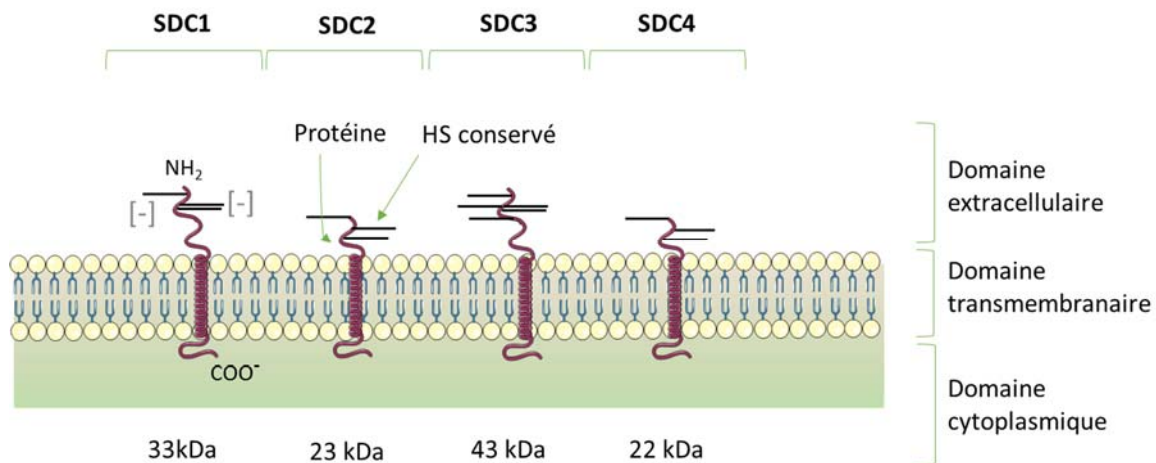


Figure 20 : Représentation schématique des syndécanes.

## Fonctions des Protéoglycanes à Héparane Sulfate

### Généralités

A l'origine découverts comme une impureté des préparations d'héparine [261], les HSPG ont longtemps été considérés comme des molécules accessoires. Cependant, on sait aujourd'hui que les HSPG sont impliqués dans de nombreux processus biologiques fondamentaux (figure 21) tels que l'adhésion cellulaire [262], la prolifération et croissance cellulaire [263,264], les stades du développement [265], la coagulation sanguine [266], l'angiogenèse [240,267], les infections virales [268,269], etc.

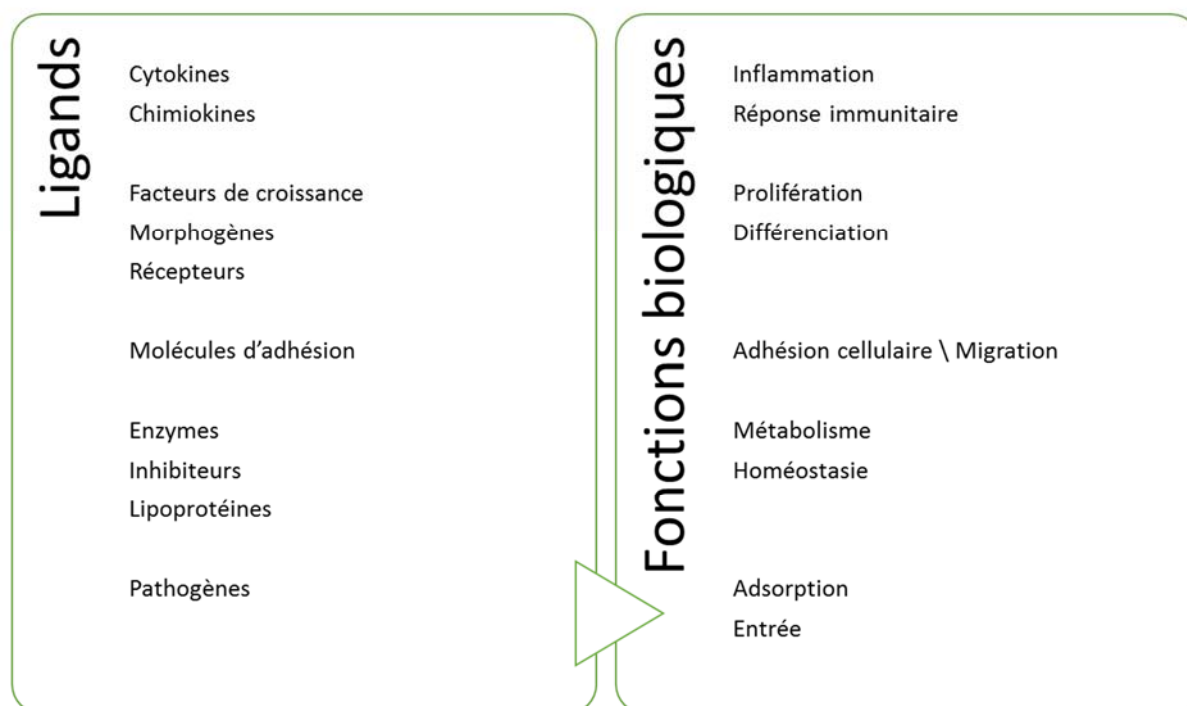


Figure 21 : Diversité fonctionnelle des protéoglycanes à héparane sulfate.

De manière générale, la plupart des observations suggèrent que les GPC agissent en tant que corécepteurs facilitant la formation de complexes récepteurs-ligands et diminuant efficacement les concentrations nécessaires de ligands (principalement des facteurs de croissance et des morphogènes, figure 22) [270]. Ils sont donc la cible de nombreuses thérapies anti-cancer et

largement étudiés dans ce contexte. Par contre, de par leur structure les SDC sont impliqués dans des processus biologiques plus variés. Par exemple, on dénombre plus de 100 ligands capables de lier le domaine extracellulaire de SDC1 [250]. Une liste non exhaustive de ces ligands se trouve en Annexe 4. Les deux paragraphes suivant traitent de l'implication des glypicanes dans différents types de cancers et quelques exemples choisis de mécanismes biologiques impliquant les syndécanes.

### **Glypicanes et Cancer**

Parmi les six membres de la famille des glypicanes, le cas du GPC3 est de loin le plus documenté et le plus complexe [271]. Par exemple, son expression est régulée à la hausse dans les cas de carcinomes hépatocellulaires [272,273]. Dans le cadre du traitement de cette pathologie, un anticorps monoclonal anti GPC-3 (nommé GC33 = IgG2a,  $\kappa$ ) a récemment été décrit [274,275] et testé en phase clinique [271]. Cependant, le développement d'anticorps anti GPC3 a longtemps été controversé car l'inhibition de GPC3 pourrait induire d'autres types de cancer. En effet, l'expression de GPC3 est inhibée dans les cellules du mésothéliome, du cancer des ovaires et du cancer du sein [276–278]. D'autre part, dans les cellules hépatiques cancéreuses HepG2, une perte de fonction de GPC-3 induirait leur prolifération [277]. Gui Su et ses collaborateurs montrent que le GPC1 est fortement exprimé dans les cellules de gliomes humains et agit comme un activateur de la prolifération cellulaire et de la signalisation de FGF-2 [279]. De manière analogue, l'expression de GPC1 est régulée à la hausse dans les cellules mammaires cancéreuses. Ceci affecte le contrôle des facteurs de croissance FGF et EGF induisant un état cellulaire pathologique [280,281]. De manière intéressante, l'étude des cellules mammaires cancéreuses révèle que le GPC4 est légèrement surexprimé (en comparaison aux cellules mammaires saines) alors que les GPC2 et GPC5 ne sont pas détectables. Des expériences *in vivo* de perte de fonction du GPC-1 dans les cellules du cancer du pancréas ont réduit leur habileté à former des tumeurs [281]. La surexpression de GPC5 promeut la prolifération des cellules tumorales comme l'a démontré le groupe du Dr. Shipley dans les cellules de rhabdomyosarcome. Le mécanisme décrit implique des facteurs de croissance FGF, d'hépatocytes (HGF) et le proto-oncogène Wnt-1 [282].

Le mécanisme d'action des GPC est encore mal connu et plusieurs évidences montrent que l'interaction des GPC avec les facteurs de croissance serait généralement non spécifique et principalement expliqué par une interaction électrostatique entre les acides aminés basiques des facteurs de croissance et les groupements sulfates et carboxyles (négatifs en solution) des chaînes HS. Cependant, des observations indiquent que la présence de résidus 6O-sulfates serait requise pour la liaison du FGF-2 [283]. Dans certains cas, la protéine centrale des GPC serait capable de lier directement les facteurs de croissance [284,285]. Le clivage de la forme membranaire des GPC permet la régulation du gradient des morphogènes (Wnt, Hhg et BMP principalement) et facteurs de croissance (FGF) agissant comme antagonistes [285] (figure 22). Ceci indique un mécanisme d'action indépendant de leur forme membranaire.

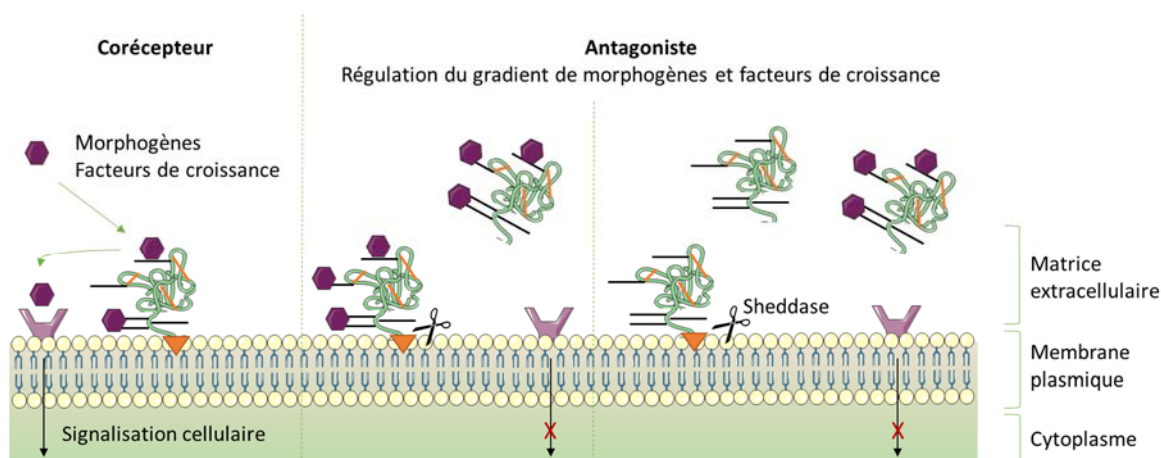


Figure 22 : Mécanismes d'action des glypicanes.

## Les syndécanes

Il existe peu d'homologie de séquence entre l'ectodomaine des quatre membres de la famille des SDC. On observe même des variations dans la séquence extra cytoplasmique d'un même SDC dépendamment de l'organisme d'origine. Ces observations ont permis de conclure à un mécanisme d'évolution rapide [251]. Ce faisant, le Dr. Couchman suggérait que la protéine centrale des syndécanes n'avait pas d'autre fonction que de porter des GAG. On sait aujourd'hui que cette vision est erronée. Dans le cas du SDC1 (figure 23), une séquence consensus de 29 acides aminés en position médiane de l'ectodomaine interagit directement avec les intégrines  $\beta 3$  et  $\beta 5$  [286] impliquées dans le processus d'adhésion cellulaire. Toutefois, la majorité des



processus biologiques faisant intervenir les SDC requiert une intervention des chaînes d'héparanes sulfates [257,284] qui peuvent lier, immobiliser, concentrer et induire un changement conformationnel des facteurs de croissance et autres molécules de signalisation [260]. Les SDC sont impliqués dans les mécanismes de prolifération, différenciation, adhésion, migration et infection cellulaire. Ils agissent la plupart du temps comme corécepteurs facilitant les liaisons ligands - récepteurs [225,287,288]). Sur le même principe, ils peuvent séquestrer un ligand inhibant sa liaison au récepteur [289,290]. Ayant été observé au niveau des points focaux d'adhésion et protrusions cellulaires ou ils colocalisent avec l'actine [291,292], on leur attribue un rôle dans les mécanismes d'adhésion et migration cellulaire en facilitant le recrutement du cytosquelette d'actine. De plus, l'interaction du domaine PDZ de la synténine-1 (protéine impliquée dans l'organisation du cytosquelette) avec la région cytoplasmique C2 des syndécans permet l'endocytose et la biosynthèse des exosomes [293,294]. Bien qu'on dénombre environ 250 motifs de liaison au domaine PDZ (PDZ-BM) dans le protéome humain [295], un seul PDZ-BM a été identifié chez les syndécans (motif EFYA) [260]. Ceci signifierait que les quatre syndécans ont la capacité d'interagir avec les mêmes protéines à motifs PDZ et donc réguleraient les mêmes voies de signalisation. Cette hypothèse est exacte dans le cas de la liaison avec la synténine-1 [296] mais la protéine CASK (une sérine kinase possédant une activité calcium/calmoduline dépendante exprimée dans les cellules neuronales où elle contrôle l'expression de gènes impliqués dans le développement cérébral) exhibe une affinité plus grande pour les SDC2 et SDC4 en comparaison des SDC1 et SDC3 [260]. Le mécanisme moléculaire expliquant cette différence d'affinité n'est pas encore connu. Un autre niveau de complexité intervient par le clivage du domaine extracellulaire des SDC qui est intensifié dans des conditions pathologiques. Ce faisant, les SDC ont la capacité d'agir comme des effecteurs ou des antagonistes solubles [297]. Pour finir, une étude a montré la localisation nucléaire du SDC1 suggérant un rôle dans la régulation de la transcription [298,299].

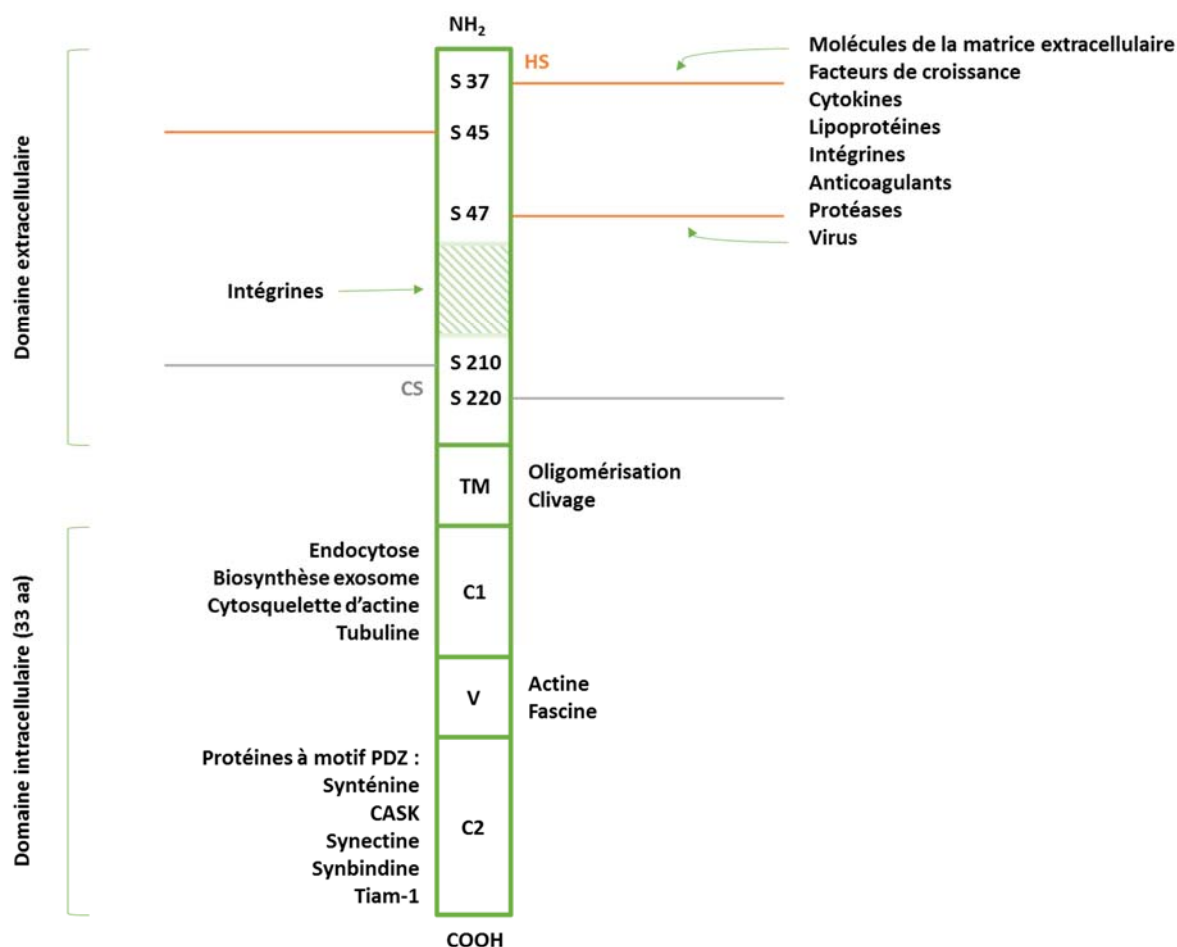


Figure 23 : Représentation schématique du syndécan-1, structure, fonctions et ligands.

## Les Protéoglycanes à Héparane Sulfate et le Transfert de Gène

### L'Attachement des Nanoparticules à la Membrane Cellulaire

L'implication des protéoglycanes membranaires dans le processus de transfert de gène a été validée pour la première fois par Mislick and Baldeschwieler en 1996 [300]. Les auteurs ont montré une diminution de l'attachement des polyplexes (PLL : ADNp) à la surface des cellules CHO-K1 préalablement exposées au chlorate de sodium inhibant la sulfatation. Ils ont également observé une réduction significative de l'attachement des polyplexes à la surface des cellules CHO-*pgs745* déficientes en xylosyltransférase, une enzyme essentielle à la synthèse des protéoglycanes. L'implication des protéoglycanes à héparane sulfate en particulier a été

mise en évidence grâce à des traitements enzymatiques faisant intervenir l'héparinase (une enzyme clivant spécifiquement les HSPG). A la suite de leurs observations, ils émettent l'hypothèse que les protéoglycanes et notamment les HSPG seraient capables de lier de manière électrostatique, et donc non spécifique, les polyplexes arborant une charge globale positive. Dans le contexte de la transfection utilisant des polyplexes à base de PEI, cette hypothèse est aujourd'hui largement acceptée et soutenue par de nombreuses études plus récentes [301–305]. Les observations des Drs. Sprouse et Reineke indiquent que conjointement à une interaction électrostatique, la liaison des nanoparticules aux HS ferait intervenir des éléments structuraux déterminants [306]. Parmi la série de glycopolymères étudiés, certains interagissent préférentiellement avec un type particulier de HS sans corrélation avec leur quantité théorique en sulfate. Bien que de nombreuses évidences montrent un rôle des HS dans l'attachement des polyplexes à la surface cellulaire, il est important de garder à l'esprit que la suppression des HSPG membranaires n'inhibe pas complètement l'attachement des polyplexes mais le réduit significativement avec pour conséquence une forte diminution de l'efficacité de transfection.

### **L'Endocytose des Polyplexes**

Suite à leur attachement à la surface cellulaire, les polyplexes doivent être internalisés. L'entrée dans la cellule des polyplexes, considérée comme une étape limitante de leur efficacité, se fait en générale par endocytose. L'étude pionnière de Mislick et Baldeschwieler révèle que l'adhésion cellulaire des polyplexes n'est pas la seule étape du transfert de gène affectée par une déficience cellulaire en HSPG. En effet, alors que la transfection des cellules CHO-*pgs745* est 50 fois moins efficace par rapport à celle des cellules contrôles CHO-K1, l'attachement cellulaire des polyplexes est seulement réduit de 5 fois [300]. Ce résultat expérimental questionne l'implication des HSPG dans les étapes du transfert de gène subséquente à l'adhésion cellulaire des polyplexes. Depuis plusieurs études ont montré l'importance des HSPG dans le mécanisme d'internalisation des polyplexes [303,305,307,308]. Tout en concluant sur le rôle inhibiteur des protéoglycanes membranaires dans le mécanisme de transfection des cellules RAA SMC (*smooth muscle cells from rabbit aortic media*), Marika Ruponen et ses collaborateurs montrent que la liaison des polyplexes aux GAG n'implique pas nécessairement leur internalisation cellulaire [309,310]. De plus, une étude comparative de trois clones

cellulaires CHO a mis en évidence que l'internalisation efficace des polyplexes n'est pas dépendante de la quantité totale de protéoglycanes membranaires mais plutôt de la relative abondance d'un type particulier de HSPG [302]. A la lumière de ses résultats, il apparaît que les HSPG devraient être étudiés individuellement plutôt que collectivement. Le rôle de SDC-1 est largement investigué dans le contexte du transfert de gène. Sa surexpression augmente l'internalisation des nanoparticules dans les cellules *Raji* (dépourvues de HSPG) et par conséquent augmente le niveau d'activité moyen de la luciférase [307]. Une étude menée dans notre laboratoire et publiée en 2008 montre que les SDC-1 et -2 ont des rôles opposés vis-à-vis du transfert de gène dans les cellules HEK293 [308]. Alors que tous deux sont capables de lier les polyplexes, l'expression de SDC1 induit leur internalisation efficace contrairement à l'expression de SDC2 qui l'inhibe. De plus, suite à l'expression combinée des deux syndécans, SDC2 a un effet négatif dominant empêchant l'internalisation des polyplexes. Autre fait intéressant, l'attachement des polyplexes au SDC1 et SDC2 provoque leur regroupement très rapide au niveau de la membrane cellulaire. Un modèle détaillé du regroupement de SDC1 a été proposé par le Dr. Kopatz et ses collaborateurs [305]. Suite à l'attachement des polyplexes de grande taille (200 - 500 nm) au SDC1, un gradient de charge se crée autour de la molécule et incite leur regroupement dans des régions de la membrane plasmique riche en cholestérol. Cette réorganisation active la protéine kinase C (PKC) et induit la liaison de l'actine au domaine cytoplasmique de SDC1 provoquant une tension membranaire responsable de l'entrée des particules dans la cellule [305]. Une étude plus récente a montré que l'ajout des polyplexes (et lipoplexes) mène également au regroupement de SDC1 et SDC2 dans les filopodes, induit ensuite la polymérisation de l'actine et, pour finir, active le transport rétrograde des complexes HSPG / polyplexes [303]. En l'absence de preuves de l'interaction spécifique des polyplexes avec les HS (à l'exception d'une interaction électrostatique), le regroupement des HSPG semble être le mécanisme le plus évident de l'internalisation des polyplexes dans la cellule.

Si l'on s'intéresse au cas du SDC1 dans un autre contexte, quelques découvertes pourraient éclaircir les mécanismes d'endocytose sous-jacents au transfert de gène. En effet, le SDC1 permet l'internalisation cellulaire de ses ligands et leur acheminement au compartiment lysosomal via le mécanisme endocytotique impliquant la formation de radeaux lipidiques [311,312]. La cinétique de ce processus implique un regroupement rapide (< 10 minutes) des

SDC1 dans des régions de la membrane plasmique riche en cholestérol. L'internalisation subséquente du ligand se fait dans une fenêtre de temps comprise entre 10 minutes et 1 heure, et nécessite une activité tyrosine kinase ainsi que la présence de microfilaments intacts d'actine [311,312]. De manière analogue, le Dr. Zong et ses collaborateurs [313] ont montré que l'endocytose d'un ligand par le SDC1 requiert l'association de son domaine cytoplasmique avec la tubuline. Jusqu'à récemment, le mécanisme d'endocytose via les radeaux lipidiques était partiellement caractérisé.

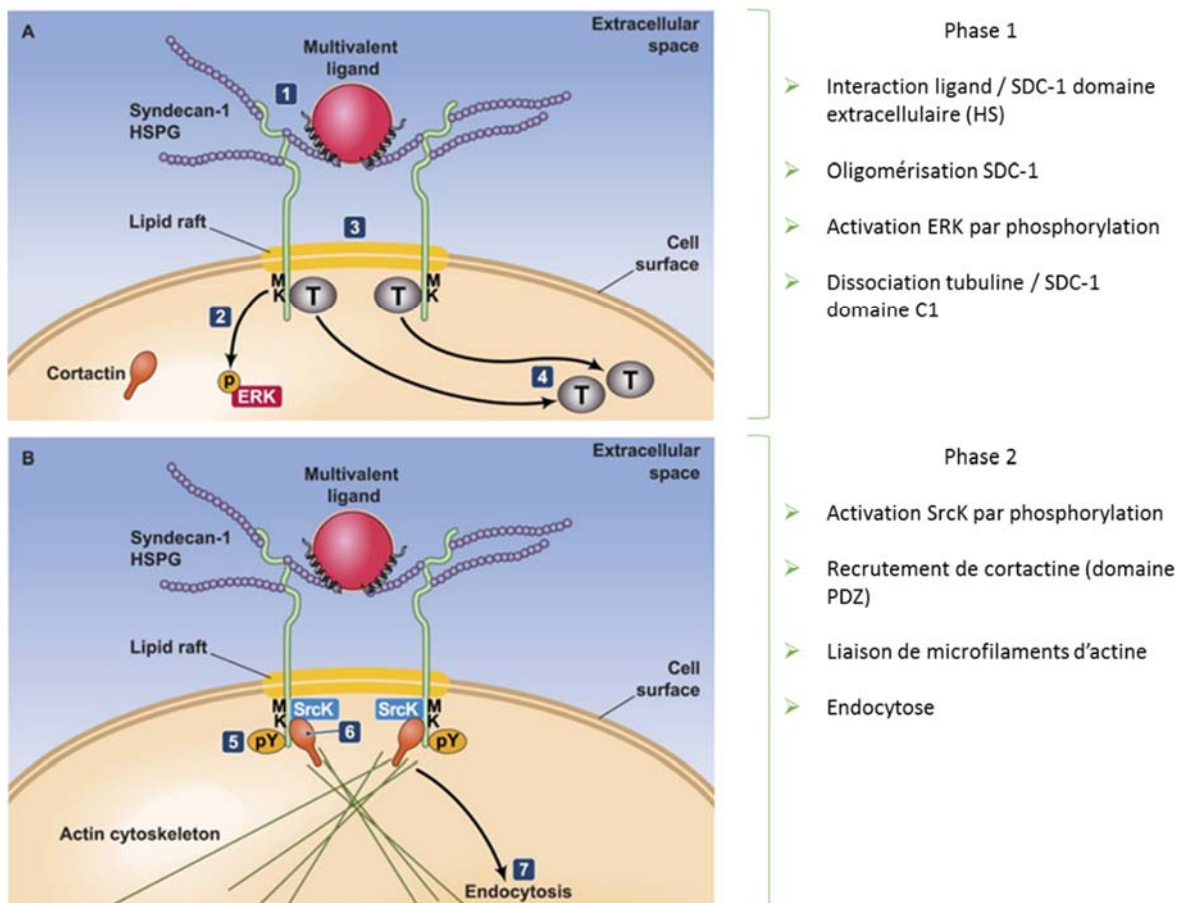


Figure 24 : Les deux phases endocytotiques d'un complexe SDC1 / ligand multivalent adaptée de Chen et Williams [314].

En 2013, Chen et Williams [314] ont mis en évidence un processus en deux étapes conduisant à l'endocytose efficace d'un complexe SDC1 / ligand multivalent (figure 24). Ils ont identifié

un motif unique (MKKK) adjacent à la membrane plasmique (domaine C1) capable de lier spécifiquement la tubuline. Le regroupement des SDC1 en réponse à un ligand permet l'activation de la tyrosine kinase ERK qui initie la dissociation des tubulines (phase 1). La seconde phase implique l'activation de la protéine tyrosine kinase Src, la phosphorylation du domaine cytoplasmique de SDC1 et le recrutement de la protéine cortactine. Cette cascade d'évènement aboutit à une endocytose induite par les microfilaments d'actine. Le domaine cytoplasmique C1 étant largement conservé d'un SDC à l'autre, on peut imaginer que le mécanisme d'endocytose décrit par les Drs Chen et Williams [314] est généralisé à tous les membres de cette famille.

### **La Dissociation des Polyplexes**

La dissociation possible des polyplexes induite par les HSPG peut complexifier l'interprétation des résultats de transfert de gène. Par un effet de répulsion de l'ADNp et ou compétitif pour l'interaction avec le PEI, les HSPG sont capables d'induire la dissociation prématurée des polyplexes limitant ainsi l'internalisation du matériel génétique [309]. Dans certains cas, l'élimination des HSPG augmente l'efficacité de transfection indiquant une meilleure maintenance de l'intégrité des polyplexes à la surface cellulaire [315]. De plus, cette dissociation semble être dépendante de la nature du polyplexe et celle des chaînes de GAG [178,316]. On pourrait donc penser que lorsqu'ils sont internalisés conjointement aux polyplexes, les HSPG seraient capables de faciliter leur dissociation intracellulaire. D'autre part, tous les membres de cette famille n'auraient pas la même prédisposition à faciliter la dissociation des polyplexes.

### **Conclusion de la revue de littérature**

La compréhension des étapes du transfert de gène qui conduisent à une expression efficace du transgène dans une cellule hôte est essentielle, tant pour augmenter ses performances que diminuer sa cytotoxicité *in vivo* et *in vitro*. Dans le contexte de la production de r-protéines à grande échelle, l'accroissement des connaissances sur les principes gouvernant le processus du transfert de gène, et le développement de méthodes et outils performants ont permis d'augmenter significativement les rendements de production. En effet, il fut un temps où un rendement final de quelques dizaines de milligrammes de r-protéines par litre de culture cellulaire était considéré

comme acceptable. Aujourd'hui, des rendements de plusieurs centaines de milligrammes voire plusieurs grammes de r-protéines par litre sont couramment obtenus. Néanmoins, la demande en r-protéines thérapeutiques ne cesse de croître stimulant dans un même temps la recherche concernant les mécanismes sous-jacents du transfert de gène. La cellule vivante étant un système complexe, plusieurs étapes du transfert de gène sont définies comme limitantes car encore mal caractérisées. Les protéoglycanes à héparane sulfate ont été proposés comme jouant un rôle clé dans l'attachement des complexes ADNp / polymères cationiques, mais leur contribution vis-à-vis des étapes subséquentes du transfert de gène reste imprécise. Pour ajouter un degré de complexité, les protéoglycanes à héparane sulfate se divisent en deux grandes familles composée chacune de différents membres qui d'un point de vue structurel et fonctionnel pourrait influencer le processus du transfert de gène de manière individuelle. Les observations présentées dans les chapitres suivants permettront d'éclaircir l'implication individuelle des protéoglycanes à héparane sulfate dans le transfert de gène et de participer à l'accroissement des connaissances dans le domaine.

## Chapitre 2 : Comprendre le Transfert de Gène par le Polyéthylènimine dans les Cellules de Mammifères CHO et HEK293

Dans ce chapitre nous avons comparé le potentiel de trois polyéthylènimines linéaires (nommés LPEI, PEI « Max » et PEIpro<sup>TM</sup>) vis-à-vis du transfert de gène dans les cellules CHO et HEK 293. A travers cette approche, notre but était de mieux comprendre la relation structure / activité du vecteur synthétique polyéthylènimine et le processus de transfert de gène dans les cellules CHO et HEK293 (figure 25).

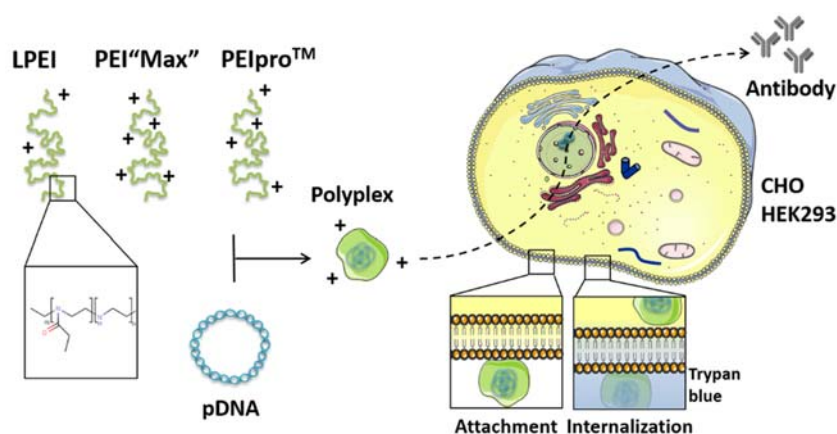


Figure 25 : Résumé graphique de l'article « Comparative study of polyethylenimines for transient gene expression in mammalian HEK293 and CHO cells ».

Brièvement, la taille et la polydispersité de chaque polymère ont été déterminées par chromatographie d'exclusion par la taille (SEC). Leur degré d'acylation respectif (présence de groupements N-propionyl limitant le nombre d'amines protonables) a été analysé par résonance magnétique nucléaire (RMN). Nous avons ensuite investigué, par des expériences de retard sur gel d'agarose, l'impact de ces caractéristiques structurales sur l'affinité des polymères pour l'ADN plasmidique et leur capacité à le condenser. Après avoir optimisées les conditions de transfection, c'est-à-dire défini le ratio PEI : ADN donnant le meilleur rendement de production



de la protéine SEAP, nous avons analysé les caractéristiques physicochimiques des polyplexes résultants. En effet, le rayon hydrodynamique des nanoparticules a été mesuré par la méthode de diffusion dynamique de la lumière (DLS) et leur charge (ou potentiel Zeta) évalué grâce à leur mobilité électrophorétique en solution. Les cinétiques d'attachement et d'internalisation des polyplexes ainsi que les cinétiques d'expression du transgène (BFP) ont été réalisées par cytométrie en flux, ceci dans le but d'observer dans quelle mesure les caractéristiques chimiques des polymères influencent l'enchaînement dans le temps des étapes du transfert de gène. Finalement, nous avons comparé l'efficacité de chaque polymère en déterminant le rendement de production de trois anticorps monoclonaux dans les cellules CHO et HEK293.

## **Comparative Study of Polyethylenimines for Transient Gene Expression in Mammalian HEK293 and CHO Cells**

### **Abstract**

Three commercially available linear polyethylenimines (25kDa LPEI, 40kDa PEI“Max” and PEIpro<sup>TM</sup>) were compared regarding their potency to transfect serum-free growing and suspension-adapted HEK293 and CHO cells. We determined the optimal DNA:PEI ratios for maximal expression of the reporter gene SEAP while monitoring cytotoxicity following transfection. PEIs acylation was determined by <sup>1</sup>H-NMR and their apparent size and polydispersity assessed by size-exclusion chromatography. The propensity of PEIs to condense plasmid DNA was evaluated by agarose-gel electrophoresis. The zeta potentials and particle sizes at optimal DNA:PEI ratio were analyzed. Polyplex attachment to the cells and internalization kinetics were monitored. The quantity of PEIpro<sup>TM</sup> needed to efficiently transfect the cells was significantly lower than with LPEI and PEI“Max” and, interestingly, the maximal amount of internalized PEIpro<sup>TM</sup>-based polyplexes was approximately half of that observed with its counterparts. PEIpro<sup>TM</sup> was the largest and least polydisperse polymer, but also the most cytotoxic. The optimal transfection conditions were subsequently used to express three monoclonal antibodies at larger-scale. The use of the deacylated PEI“Max” and PEIpro<sup>TM</sup> resulted in a significant increase of recombinant protein expression compared to LPEI. These

findings demonstrate the importance of properly choosing the most suitable polymers to obtain optimal recombinant protein transient expression.

Keywords: acylation, polyplex, attachment, internalization, transfection, recombinant protein.

## **Introduction**

Large-scale transient gene expression (TGE) in mammalian cells is widely used for the fast production of recombinant proteins (r-proteins) that require proper folding, assembly and post-translational modifications for their biological activities. TGE can generate milligram to gram quantities of r-proteins within a few days [16,317,318] and thus supersedes the long, tedious and costly process associated with the establishment of high-producing stable cell lines. CHO (Chinese hamster ovary) and HEK293 (human embryonic kidney 293) cell lines have been successfully used as transient expression systems. While transfection of serum-free adapted and suspension-growing mammalian cells can be performed by a variety of transfection reagents [319], polyethylenimine (PEI), a cationic polymer, is probably the most widely used, characterized and cost-effective reagent for large-scale applications [16,317].

Linear PEI (LPEI) with an average molecular weight of 25 kDa is routinely used for TGE because it exhibits high transfection efficiencies and low cytotoxicity [149,320,321]. LPEI contains residual N-propionyl groups that reduce the number of protonatable nitrogen residues and as such may limit nucleic acid condensation and endosomal escape [133]. Indeed, nearly fully deacylated LPEIs have been developed and shown to be superior for mammalian cell transfection [119,120]. Commercially available deacylated PEIs are known as PEI“Max” (Polysciences) and PEIpro™ (Polyplus Transfection). The impact of LPEI acylation levels on transfection efficacy has however shown contradictory results [137–139].

Improvement of large-scale mammalian cell transfection systems can be achieved through fine-tuning multiple parameters such as the expression vector, transfection reagent, cell line, culture medium and feed addition post-transfection. The proper selection of the transfection reagent thus represents an easy parameter to optimize and may have significant impact on TGE process. With this aim in mind and to further understand the impact of structure-function relationship of

PEI on TGE bioprocesses, we characterized and compared the potency of three commercially available PEIs, namely the 25kDa LPEI, 40kDa PEI“Max” and PEIpro™ for their abilities to transfect HEK293 and CHO cells growing in suspension culture in the same serum-free medium. <sup>1</sup>H-NMR analysis of the three PEIs revealed that the degree of acylation is very low ( $\leq 3\%$ ) in all three polymers, with PEI“Max” being the most deacylated one. Determination of the apparent molecular weight and polydispersity by size-exclusion chromatography showed that LPEI and PEI “Max” are very polydisperse while PEIpro™ is significantly larger and monodisperse. All polymers showed similar capacity to condense plasmid DNA as shown by agarose-gel electrophoresis. Under optimal DNA:PEI ratio for achieving maximal r-protein expression, the polyplexes average size and zeta potential at physiological pH were relatively similar. Correlation between the r-protein yield and the polyplexes uptake and endocytosis kinetics as well as cytotoxicity post-transfection was also investigated. The optimal transfection conditions determined at small-scale were then applied to express three monoclonal antibodies (mAbs) in HEK293 and CHO cells at the 500 mL-scale in shaker flask cultures. The results confirmed that PEI“Max” and PEIpro™ were the most efficient polymers for achieving highest productivities in the two cell lines.

## Materials and Methods

### Materials

The 25 kDa LPEI and 40 kDa PEI“Max” were obtained from Polysciences (Warrington, Pennsylvania, USA). PEIpro™ was from Polyplus-transfection (Illkirch, France). YOYO-1® iodide (1 mM solution in DMSO), trypan blue solution 0.4% (w/v), serum-free Freestyle™17 (F17) expression medium and propidium iodide (PI) were purchased from Life Technologies Inc. (Burlington, Ontario, CA). The pTT expression vectors [322] encoding for the blue fluorescent protein (BFP), secreted alkaline phosphatase (SEAP), *Trastuzumab*, *Palivizumab*, or chimeric B72-3 [323] (hy4) light (LC) and heavy (HC) chains were used to optimize and monitor the transfection process (list in table 1). Plasmids were amplified in *E.coli* (DH5α) and purified using an in-house endotoxin-free process (unpublished). L-glutamine and Pluronic® F-68 were obtained from Sigma-Aldrich® (Oakville, Ontario, CA)

## Cell Culture

The 293-6E and CHO-3E7 cell lines stably expressing truncated Epstein-Barr virus Nuclear Antigen-1 were maintained as a suspension culture in F17 medium supplemented with 4 mM L-glutamine and 0.1% pluronic® F-68. CHO-3E7 cells were routinely diluted every two to three days at  $0.3 \times 10^6$  cells/mL ( $0.07 \times 10^6$  cells/mL for weekends) in 50 mL total volume in a 250 mL plastic Erlenmeyer flask (Corning®). 293-6E cells were also diluted every two to three days at  $0.5 \times 10^6$  cells/mL ( $0.25 \times 10^6$  cells/mL for weekends). Cell cultures were operated on an orbital shaking platform at an agitation rate of 120 rpm at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Cell density and cell viability were determined by direct counting of cell samples with a Cedex automated cell counting system (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) using the trypan blue exclusion method.

*Tableau 1 : Vectors used in this study.*

*Expression of the genes of interest are under the control of the constitutive promoter CMV5 [324].*

Vector name	Description
pTT-BFP	blue fluorescent protein
pTToc3-SEAP	secreted alkaline phosphatase
pTT5-B723LC	B72-3 light chain
pTT5-B723HC	B72-3 heavy chain
pTT5-SNGSLC	Synagis light chain
pTT5-SNGSLH	Synagis heavy chain
pTT5-TZMLC	Trastuzumab light chain
pTT5-TZMHC	Trastuzumab heavy chain

## Transfection

Transfections were performed at a cell density of  $2.0 \times 10^6$  cells/mL with viability greater than 98%. The cell suspension was distributed in 6-well plates (1.8 mL/well). Prior to transfection

and when mentioned, the pTT-BFP reporter plasmid was labeled by mixing 2  $\mu$ L of 1 mM YOYO-1 with 50  $\mu$ g of DNA followed by an incubation for 2 hours in the dark at room temperature. All DNA:PEI polyplexes were prepared in 5% of the initial culture volume with a total of 1  $\mu$ g DNA/mL of culture to be transfected. An equal volume of diluted PEI was added to the DNA. The mixture was inverted and incubated for 10 minutes at room temperature before its addition to cell culture.

### **Secreted Alkaline Phosphatase Activity Measurement**

Determination of SEAP activity was performed as previously described [325]. Briefly, SEAP was assessed at 6 days post-transfection (dpt). SEAP-transfected cells were centrifuged and the supernatant was diluted in water (1/1000). Fifty microliters of diluted supernatant were transferred to a 96-well plate and mixed with an equal volume of SEAP assay solution containing 20 mM paranitrophenyl phosphate (pNPP), 1 mM  $MgCl_2$ , and 1 M diethanolamine. Absorbance was read at 405 nm at 1-minute intervals for 5 minutes.

### **Antibodies Production**

Cells grown in 2L-shaker flasks to a density of  $2.0 \times 10^6$  cells/mL were co-transfected with the *Trastuzumab*, *Palivizumab* or *B72-3* LC and HC plasmids at a LC:HC ratios of 1:1, 1:1 or 3:2 (w:w), respectively. A 54-mL suspension of polyplexes was incubated for 10 minutes before being added to the cultures. Twenty-four hours later, the cultures were fed with Tryptone N1 at 0.5% w/v final for 293-6E cells or 1% w/v final for CHO-3E7. One mL culture samples were collected daily for 8 dpt. Antibody titers were determined by protein-A HPLC using a 800  $\mu$ L POROS® 20 micron Protein-A ID Cartridge (Applied BioSystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The protein-A HPLC method showed less than 5% inter-assay variation and was validated using a calibrated USP standard (Synagis®).

### **Quantification of N-propionyl Residues**

We quantified the amount of N-propionyl residues in each polymer backbone as their abundance influences the number of protonatable amines and thus, may have significant impact on polyplexes formation and transgene expression. Prior to analysis, PEI“Max” and LPEI were

diluted in a mixture of 90% phosphate-buffered saline and 10% D<sub>2</sub>O at a concentration of 4.5 mg/mL. For PEIpro<sup>TM</sup>, a 1 mg/mL stock solution was concentrated 5 times using Amicon Ultra-15 (3K) centrifugal filter cartridge (Millipore) and diluted in D<sub>2</sub>O at a concentration of 4.5 mg/mL. NMR experiments were performed at 298K on a Bruker Avance 800 NMR spectrometer equipped with a 5mm z-gradient PATXI probe. One-dimensional (1D) <sup>1</sup>H-NMR spectra were acquired with 512 scans, 4 dummy scans and a spectral width of 20.0332 ppm using 32k data points. Water suppression was achieved using excitation sculpting with gradients [326]. The multiplicity edited two-dimensional (2D) <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) experiment [327] was collected as a 512 x 64 complex data matrix with spectral widths of 10.0166 ppm in the <sup>1</sup>H dimension and 80 ppm in the <sup>13</sup>C dimension, and 128 scans for each increment. All NMR spectra were processed with the Bruker TopSpin<sup>TM</sup> 3.0 software. Prior to Fourier Transformation, the 1D <sup>1</sup>H time domain data were zero-filled to 64k data points and an exponential line broadening factor of 1 Hz was applied. The 2D time domain data at the <sup>13</sup>C dimension was extended by linear prediction followed by zero filling obtaining the data size of 2048 x 512 along the <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C dimensions, respectively. A  $\pi/2$  shifted cosine window functions were applied in both <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C dimensions.

### Flow Cytometry Analysis

Polyplexes attachment to the cell surface, internalization and transgene expression kinetics were performed at 10 minutes, 1, 2, 3.5, 4.5, 7, 24, 30 and 48 hours post-transfection (hpt). Two hundred microliters aliquots of transfected cell culture were taken from the 6-well plates and filtered through a 310  $\mu$ m mesh Nitex tissue (Sefar Group). Fluorescence signals of YOYO-1 labelled DNA were recorded on a BD LSR II flow cytometer (BD Biosciences). Then, a 0.4% (w/v) trypan blue solution was added to a final concentration of 0.2% to quench cell surface-associated fluorescence, thus allowing for DNA internalization quantification. Data obtained were mean fluorescence units of 10,000 single viable cells. To assess integrity of the cell membrane, 2  $\mu$ L of a 1 mg/mL propidium iodide (PI) solution in water were added to each tube containing 200  $\mu$ L of transfected cell culture. Cells were vigorously mixed before analysis. Viable cell density was determined by flow cytometry using a dot plot of forward light scatter versus 90° side scatter.

## Results

### Optimization of DNA:PEI Ratios for HEK293 and CHO Cells Transfection

We first established the DNA:PEI ratio leading to maximal gene expression in 293-6E and CHO-3E7 cells for LPEI, PEI“Max” (referred as PEI<sub>max</sub> hereafter) and PEI<sub>pro</sub><sup>TM</sup>. Culture media are known to significantly impact transfection efficiencies due to the presence of various components such as anti-aggregation polymers and chelating agents [328,329]. To avoid discrepancies in data interpretation resulting from the use of different culture media, both 293-6E and CHO-3E7 cells were adapted to the same protein-free, chemically-defined F17 medium and transiently transfected with a pTT plasmid encoding SEAP. The optimal DNA concentration of 1 µg per mL of cell culture and the incubation time (10 min) that allowed for proper complex formation were previously determined in our group (data not shown).

*Tableau 2 : Optimal DNA:PEI ratios leading to the most efficient SEAP expression. Ratios are given in w:w (weight) and equivalent amine (N in PEI) to phosphate (P in DNA) ratios.*

	293-6E		CHO-3E7	
	w:w	N:P	w:w	N:P
LPEI	1:3	23:1	1:8	61:1
PEI“Max”	1:3	13:1	1:5	21:1
PEI <sub>pro</sub> <sup>TM</sup>	1:1	4:1	1:2,5	11:1

Fig. 26A displays the productivities obtained following transfection of 293-6E cells. We can observe an overall bell-shaped profile of the SEAP expression level as a function of the DNA:PEI ratio employed. As a decline in SEAP expression concomitant with a drastic decrease in viability were observed, a maximal concentration of 3 µg and 4 µg PEI<sub>pro</sub><sup>TM</sup> per µg DNA was used to transfect HEK293 and CHO cells. The optimal ratio was found to be 1:3 (w:w) for LPEI and PEI<sub>max</sub>, and between 1:1 to 1:1.5 for PEI<sub>pro</sub><sup>TM</sup>. Similarly, the optimal DNA:PEI ratios were determined for CHO-3E7 cells (Fig. 26B). At 6 dpt, the highest level of SEAP obtained with PEI<sub>pro</sub><sup>TM</sup> was achieved at a DNA:PEI ratio of 1:3 while it was obtained with

ratios of 1:5 and 1:8 for PEI<sub>max</sub> and LPEI, respectively. These optimal ratios to transfect 293-6E and CHO-3E7 cells are summarized in Table 2.

### **Cytotoxicity of PEIs-based Polyplexes**

As previously reported [129,330], increasing the quantity of PEI beyond a certain level results in decreased productivity due to increased cytotoxicity. The overall system performance is thus the result of an ideal balance between transfection efficacy and cytotoxicity. Therefore, we investigated the cytotoxicity of each PEI-based polyplexes at 48 hpt using the PI fluorescent dye exclusion assay. The mean intensity of PI-positive cells after transfection (dashed lines) was determined by flow cytometry and represented in Fig. 26C (293-6E) and 26D (CHO-3E7). We observed an increase in PI incorporation with increasing DNA:PEI ratios for both cell lines. These data suggest a significant change in plasma membrane integrity and perhaps membrane function once the cells come into contact with polyplexes and/or free PEIs. Losses in cell membrane integrity were correlated with a decreased 293-6E and CHO-3E7 cell viability (solid lines) as shown in Fig. 26 (panels C and D, respectively). Cell culture viability was assessed by the light scattered by the cells during flow cytometry analysis. Viability decreased with increasing quantity of PEIs. We found that PEI<sub>pro</sub><sup>TM</sup>-based polyplexes were the most toxic for both cell lines, reducing the viability of 293-6E and CHO-3E7 cells by 42 % and 18%, respectively, at a concentration of 3 µg/mL. It was correlated with the fastest increase in PI intensity compared to that of LPEI- and PEI<sub>max</sub>-based polyplexes. However, at the optimum DNA:PEI ratios for maximal SEAP productivity, cell cytotoxicity remained low and were comparable for all polymers (viable cell density 93% ± 0.1 for LPEI, 91% ± 0.3 for PEI<sub>max</sub> and 92% ± 0.9 for PEI<sub>pro</sub><sup>TM</sup>).



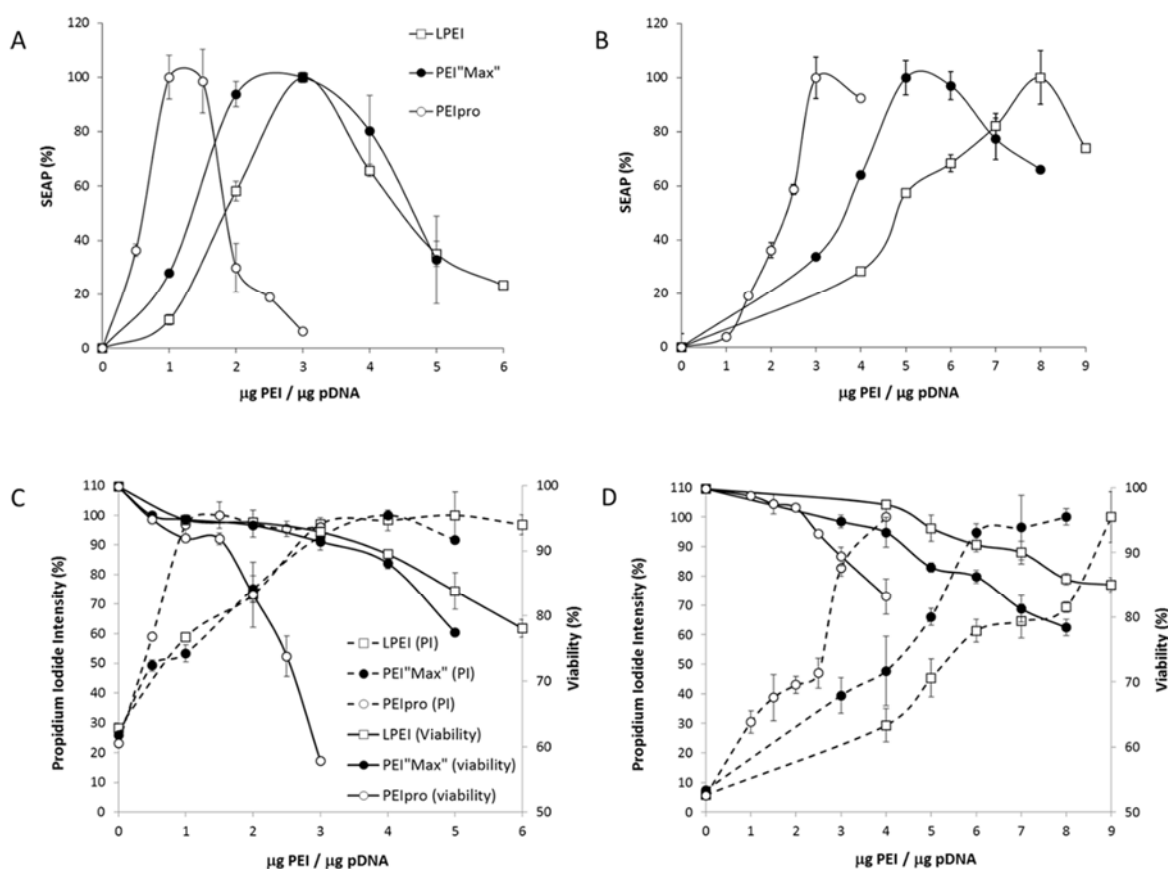


Figure 26 : PEIs-mediated transfection of HEK293 and CHO cells, propidium iodide labeling and viability determination.

Increasing concentrations of polymers were used to form polyplexes using 1 μg of plasmid DNA. The SEAP activity present in the culture medium from HEK293 (A) and CHO (B) cells was determined at day 6 post-transfection and reported as percentage of SEAP expression relative to their corresponding maximal expression for each polymer. Propidium iodide labeling was used to measure the membrane integrity of HEK293 (C) and CHO (D) cells 48 hpt. Viability (as determined by flow cytometry analyses) of transfected HEK293 (C) and CHO (D) cells was determined at 48 hpt. Results were normalized to controls without transfection and are representative of three independent experiments conducted in triplicate.

## Acylation Level of Polyethylenimines

The multiplicity edited  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) experiment was performed to assign the CH, CH<sub>2</sub> and CH<sub>3</sub> groups in the PEIs backbone. We determined the abundance of methyl (–CH<sub>3</sub>) groups in the three PEI solutions as a measure of acylation levels. As PEI<sub>max</sub> and PEI<sub>pro</sub><sup>TM</sup> are claimed to be extensively deacylated compared to LPEI (according to both manufacturers), a significant reduction in the methyl group signal is expected. The 1D  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of each PEI is shown in Fig. 27. The signals centered at 3.20, 2.95 and 3.00 ppm (peak a) could be assigned as the methylene (–CH<sub>2</sub>–) protons adjacent to amide groups in the ethylenimine unit. The triplet peaks (d) centered at 1 ppm originated from the methyl protons of N-propionyl ethylenimine unit. The successful removal of N-propionyl chains in the PEI<sub>max</sub> and PEI<sub>pro</sub><sup>TM</sup> was confirmed by the loss of the peaks b and d that are well visible in the LPEI spectrum. From the 1D  $^1\text{H}$ -NMR spectra, the CH<sub>3</sub>:CH<sub>2</sub> ratios were determined by calculating the relative area of methylene proton peaks in the ethylenimine backbone to the methyl signal of the N-propionyl ethylenimine units. As expected, the data suggest that LPEI exhibits more N-propionyl groups with a CH<sub>3</sub>:CH<sub>2</sub> ratio of 2.01:100, while it is reduced to 0.16:100 and 0.35:100 for PEI<sub>max</sub> and PEI<sub>pro</sub><sup>TM</sup> respectively. Thus, PEI<sub>max</sub> and PEI<sub>pro</sub><sup>TM</sup> bear respectively 12- and 6-times less propionyl groups compared to LPEI.

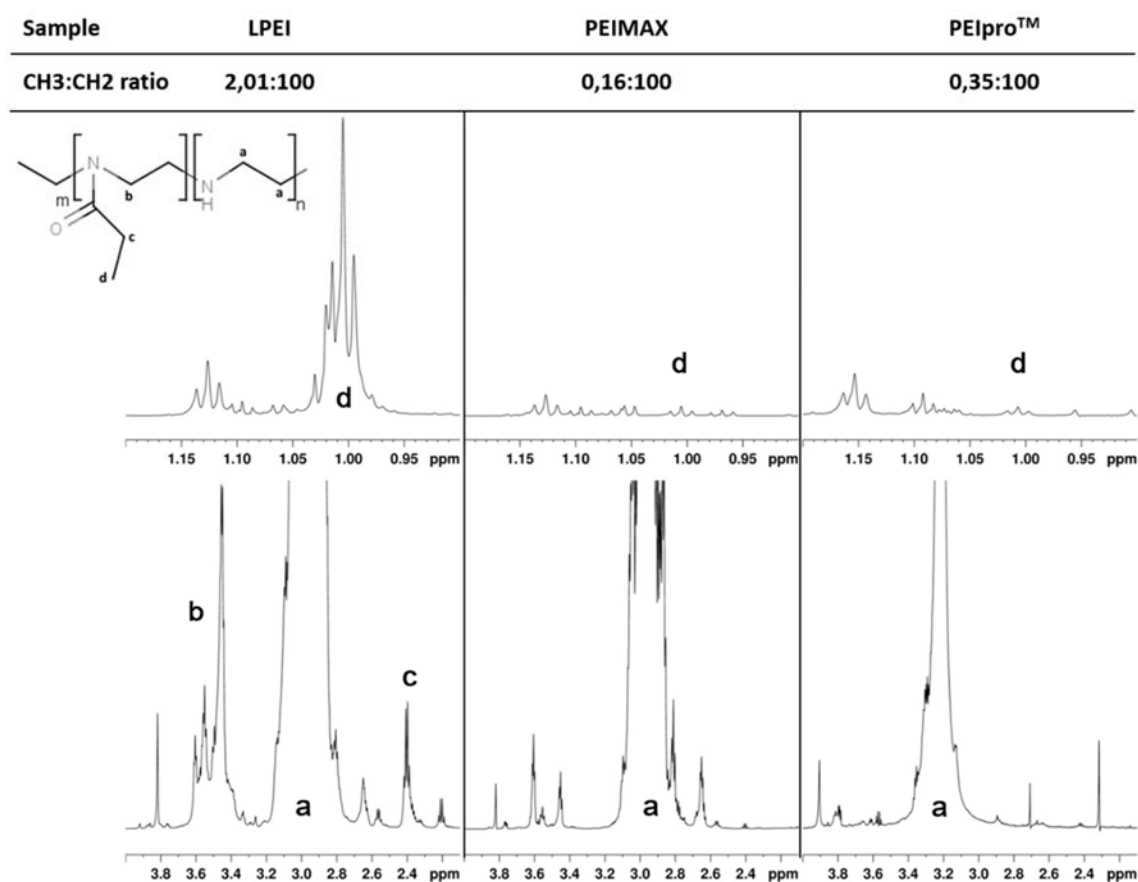


Figure 27 : 1D  $^1\text{H}$ -NMR spectra of partially acylated LPEI and fully deacylated PEI“Max” and PEIpro™.

### Attachment and Endocytosis Kinetics of Polyplexes

We evaluated the attachment and internalization kinetics of polyplexes by flow cytometry in 293-6E (Fig. 28, panels A-C) and CHO-3E7 (Fig 28, panels D-F) cells to examine whether binding and/or uptake of polyplexes differ between PEI types and cell lines. In this experiment, the optimal DNA:PEI ratio determined previously was used (Table 2). Polyplexes were prepared with PEIs and YOYO-1 labeled pTT-BFP vector. Although YOYO-1 intercalates into DNA before polyplexes were formed, it has been shown that YOYO-1 labeling does not affect DNA packaging [331] nor the transgene expression (our observation, data not shown). A first measure of fluorescence issued from cell surface-bound and internalized YOYO-1 labeled DNA was

achieved by flow cytometry. This measure was referred to as polyplexes "attachment". A second measure was performed following quenching extracellular fluorescence with the membrane-impermeant dye trypan blue [332]. This measures internalized polyplexes and is referred to as polyplexes "endocytosis".

With 293-6E cells, a very fast attachment of LPEI-, PEI<sub>max</sub>- and PEI<sub>pro</sub><sup>TM</sup>-based polyplexes was detected at 10 mpt with more than 99% of HEK293 cells being YOYO-1-positive (empty circles of Fig 28. panels A, B and C respectively). However, flow cytometry analysis in the presence of trypan blue showed that internalization kinetic was polymer-dependent, with polyplexes made with PEI<sub>pro</sub><sup>TM</sup> being the most rapidly internalized by 293-6E cells, followed by those made with PEI<sub>max</sub> and finally LPEI, with 91.8%, 78.9% and 46.8% of cells showing internalized polyplexes at 10 mpt (closed circles of panels A, B and C respectively). Even though all 293-6E cells had internalized polyplexes after 1 hpt (closed circles), the overall capture/internalization of fluorescent polyplexes per cell still increased rapidly until 7 hpt (empty and black squares of panels A, B and C). Contrary to PEI<sub>max</sub> and PEI<sub>pro</sub><sup>TM</sup> polyplexes, LPEI-based polyplexes were still taken up by 293-6E cells after 7 hpt until 30 hpt (black squares of Fig. 28A). Interestingly, the mean fluorescence intensity analysis showed that the amount of PEI<sub>pro</sub><sup>TM</sup>-based polyplexes bound and internalized by 293-6E cells was half that of LPEI and PEI<sub>max</sub>.

For CHO-3E7 cells, a rapid and efficient binding of polyplexes was also measured at 10 mpt, with more than 99% of cells being YOYO-positive when using LPEI, PEI<sub>max</sub> and PEI<sub>pro</sub><sup>TM</sup> (empty circles of Fig. 28 panels D, E, F respectively). Flow cytometry analysis in the presence of trypan blue showed that internalization kinetic was also polymer-dependent, but this time PEI<sub>max</sub> was the most rapidly internalized followed by LPEI and finally PEI<sub>pro</sub><sup>TM</sup>, with respectively 71.9%, 54.3% and 43.5% of cells showing internalized polyplexes at 10 mpt (closed circles of panels E, D and F, respectively). As observed with 293-6E cells, all CHO-3E7 cells had internalized polyplexes at 1 hpt (closed circles) and the maximal amount of internalized PEI<sub>pro</sub><sup>TM</sup>-based polyplexes was approximately half of that observed with LPEI and PEI<sub>max</sub> polyplexes. The time needed to reach the maximal amount of attached (empty squares) and endocytosed (black squares) polyplexes by CHO-3E7 cells was longer compared to 293-6E

cells. Maximum mean fluorescence intensities were reached at 24 hpt for PEI<sub>max</sub>- and PEI<sub>pro</sub><sup>TM</sup>-based polyplexes (panels E and F) whereas it still slightly increased after 24 hpt for LPEI-based polyplexes.

### **Blue Fluorescent Protein Expression**

Polyplex binding and internalization is merely the first step for an efficient TGE. Once internalized, the DNA has to reach the nucleus in order to be efficiently transcribed. Blue fluorescent protein (BFP) expression was monitored to verify and compare the efficacy of the three PEIs for TGE. The time needed for detectable BFP gene expression (closed bars), despite the small percentage of positive cells (hatched bars), was comparable for all PEIs tested, being of 7 hpt for 293-6E and 4.5 hpt for CHO-3E7 cells (Fig. 28). The transfection efficiencies given by the percentage of BFP-positive cells were still increasing at 48 hpt for 293-6E cells while it peaked at 30 hpt for CHO-3E7 cells. Our transfection protocol leads to an efficient BFP expression in both cell types using the three different PEIs. In fact, 68 to 84% of 293-6E and 58 to 80% of CHO-3E7 cells expressed the transgene.

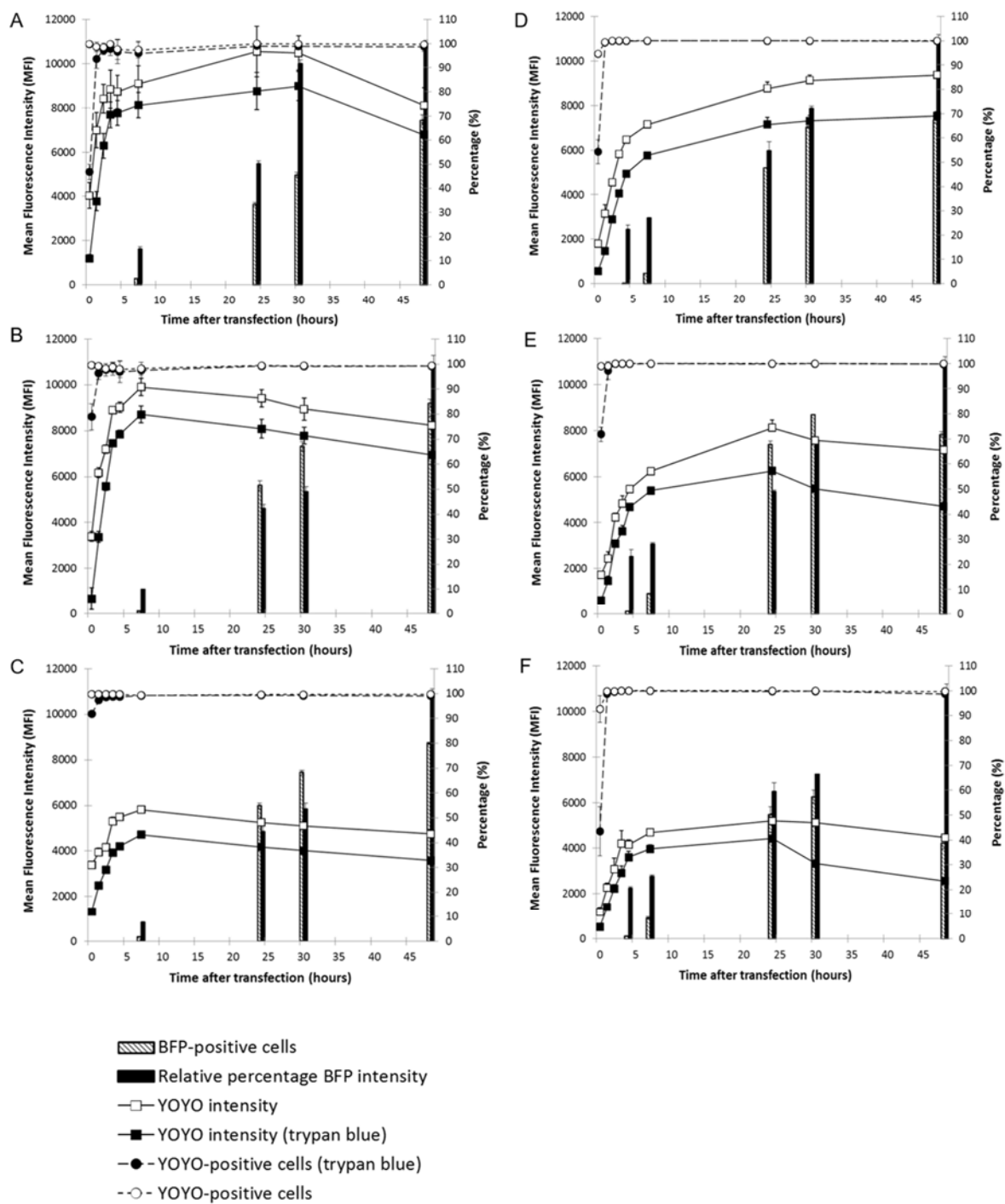


Figure 28 : Uptake kinetics of PEI-based polyplexes and blue fluorescent protein expression. HEK293 (A-C) and CHO (D-F) were transfected with LPEI (A,D), PEI'Max' (B,E) and PEIpro™ (C,F). Polyplexes were formed with optimal DNA:PEI weight ratios (Table 2). Prior

to complexation, DNA were labeled with YOYO-1. The DNA/YOYO-1 mean fluorescence intensity associated with the cells (empty squares), the percentage of cells with bound polyplexes (empty circles), the mean fluorescence intensity of internalized polyplexes (filled squares) and percentage of cells with internalized polyplexes (filled circles) were quantified by flow cytometry. BFP was used as reporter protein to determine transfection efficiencies. The BFP mean fluorescence intensity (dashed bars) and percentage of BFP-positive cells (black bars) were also measured by flow cytometry at indicated times post-transfection. Data are an average of three independent experiments.

### **Antibody Productions**

Finally, we compared the effectiveness of the three PEIs for the expression of three different mAbs. Expression of *Trastuzumab* (Fig. 29A and B), *Palivizumab* (Fig. 29C and D) and the chimeric *B72-3* (Fig. 29E and F) mAbs was performed by co-transfection of plasmid DNA encoding the light (LC) and heavy (HC) chains. The optimal DNA:PEI ratios determined previously (Table 2) were used to transfect 500 mL cell cultures in 2 L-shaker flasks. Samples were collected daily and antibody titers were measured by protein-A HPLC. Productions were harvested 8 dpt when the viabilities were 40-70% (data not shown). The measured antibody titers were greater in both cell lines when using PEI<sub>max</sub> and PEI<sub>pro</sub><sup>TM</sup> compared to LPEI. For HEK293 cells (panels A, C, E), transfections using PEI<sub>max</sub>-based polyplexes lead to highest expression for all antibodies even though PEI<sub>pro</sub><sup>TM</sup> resulted in yields only slightly lower for the *Trastuzumab* antibody. For CHO cells (panels B, D, F), the use of PEI<sub>max</sub> and PEI<sub>pro</sub><sup>TM</sup>-based polyplexes consistently resulted in highest antibody titers. The maximum *Trastuzumab*, *Palivizumab* and chimeric *B72-3* antibody titers obtained when using PEI<sub>max</sub> were respectively 346, 791 and 653 mg/L for 293-6E cells and 71, 79 and 140 mg/L for CHO-3E7 cells. Growth curves and percentage of viabilities related to each antibody production are presented in supplemental data (Fig. 30).

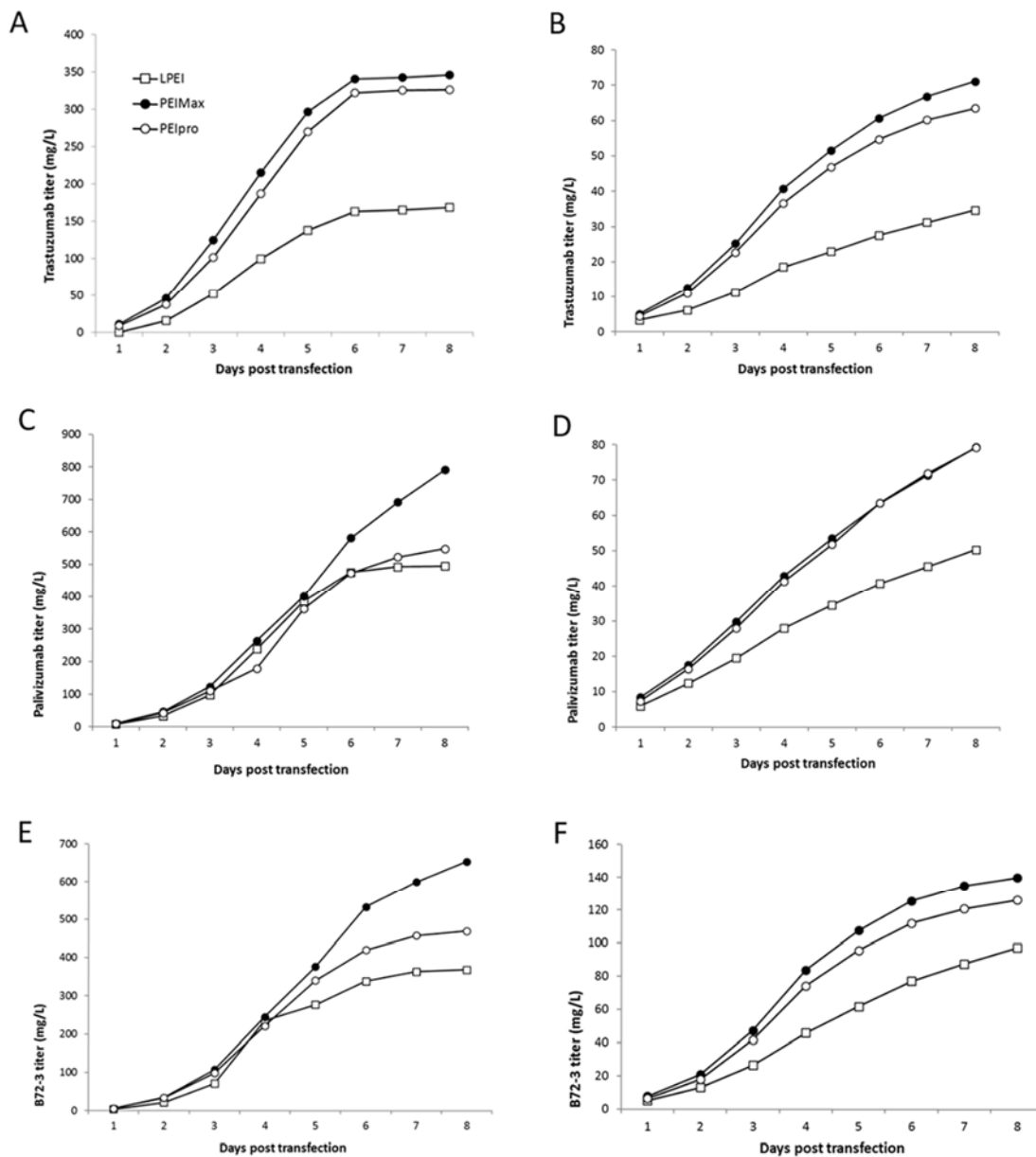


Figure 29 : Antibody expression following transfection with PEIs.

Five hundred milliliters of HEK293 (A, C, E) and CHO (B, D, F) cell cultures were transfected with LPEI (empty squares), PEI“Max” (filled circles) and PEIpro™ (empty circles) using optimal DNA:PEI weight ratios for each polymer (Table 2). The cultures were sampled daily up to 8 days post-transfection. Titers of the monoclonal antibodies Trastuzumab (A, B), Palivizumab (C, D) and B72-3 (E, F) were determined by protein-A HPLC.



## Discussion

The increasing need for the fast production of quantities of recombinant proteins (r-proteins) has led to the development of large-scale TGE in animal cells cultivated in serum-free suspension cultures. Although PEIs are efficient synthetic gene delivery vehicles, their efficacy (expression level obtained per gene copy delivered) is much lower than that of viral vectors [83,333]. Chemical modifications of PEIs have been performed to enhance one or more events involved during polyplex-mediated gene delivery, such as binding to the cell surface, entry into the cells *via* endocytosis, escape from the endosomal compartment, translocation to the nucleus and polyplex unpacking [130,133]. In the present study, we compared three commercially available linear PEIs, LPEI, PEI<sub>max</sub> and PEI<sub>pro</sub><sup>TM</sup>, for their ability to transfect HEK293 and CHO cell lines. We first optimized the DNA:PEI ratios for each cell line in order to find the one supporting the highest volumetric productivity using the reporter protein SEAP. For each cell line and PEI used, this condition represents the “sweet spot” defined by the compromise between transfection efficiency and cell viability. As previously described, the quantity of internalized DNA and the level of transgene mRNA production can be increased beyond the maximal volumetric productivity condition by increasing the amount of polyplexes on a per cell basis, but this does not result in improved transgene expression, due to reduced cell growth and/or viabilities associated with PEI cytotoxicity [129]. Our <sup>1</sup>H-NMR analysis indicated that LPEI polymer is 97.9% deacylated (i.e. 2.1% of propionyl group), consistent with previous data [198], while PEI<sub>max</sub> and PEI<sub>pro</sub><sup>TM</sup> polymers are 99.8% and 99.6% deacylated, respectively. Increasing the number of protonatable amine residues may improve endosomal escape of polyplexes via the “proton sponge effect” and consequently, increase the transfection efficacy [117,119,334]. We could also observe from the major NMR methylene chemical shifts distribution that the PEI<sub>pro</sub><sup>TM</sup> polymer is more uniform than LPEI and PEI<sub>max</sub> polymers. This observation is confirmed by SEC analysis (see Fig. 31 in data in brief [335]) whereby the elution profile of PEI<sub>pro</sub><sup>TM</sup> was more homogeneous than that of LPEI and PEI<sub>max</sub>, indicating that the latter are significantly more polydisperse. The peak b observed on LPEI 1D <sup>1</sup>H-NMR spectrum corresponds to the methylene protons in the ethylenimine unit that are adjacent to N-propionyl groups. As expected, the vanishing of this peak in PEI<sub>max</sub> and PEI<sub>pro</sub><sup>TM</sup> <sup>1</sup>H-NMR profiles was correlated with the elimination of N-propionyl chains. Even though our results confirmed that

PEI<sub>max</sub> and PEI<sub>pro</sub><sup>TM</sup> are more deacylated than LPEI, the additional number of protonatable amines seems minor. According to our NMR experiment and assuming a molecular weight of 25 kDa, there is 19.25 and 21.46 additional protonatable amines per mole of PEI<sub>pro</sub><sup>TM</sup> and PEI<sub>max</sub> respectively. We wanted to know if this difference, as small as it is, could significantly affect physico-chemical characteristics of our polyplexes and thus r-protein production yields. Not surprisingly, the gel retardation assay experiment (see Fig. 32 in data in brief [335]) showed that deacylated PEI<sub>pro</sub><sup>TM</sup> and PEI<sub>max</sub> did not significantly increase their DNA condensation ability. Interestingly, when polyplexes were formed at optimal DNA:PEI ratios, size distribution and zeta potential measurements (supplemental data Table 3) showed that all three PEIs could condense DNA into particles of small sizes (Z-average between 66 and 96 nm) compatible with efficient endocytosis [336] and comparable zeta potentials (22-32 mV). However, when optimizing the DNA:PEI ratios to adequately transfect HEK293 and CHO cells, we found that the fraction of unbound, or free PEI, is specific to each polymer and cell line. For instance, we observed that 0.6, 2.5 and 2.5 µg excess of PEI<sub>pro</sub><sup>TM</sup>, PEI<sub>max</sub> and LPEI respectively are needed per µg of DNA to optimally transfect HEK293 cells whereas this amount is increased to 2.1, 4.5 and 7.5 µg respectively for CHO cells. No correlation between the degree of deacylation and the optimal quantity of PEI was observed. Perhaps polydispersity and average size of a polymer are more important physico-chemical characteristics for the formation of TGE-competent nanoparticles. Indeed, efficient transfection required less free PEI<sub>pro</sub><sup>TM</sup> which exhibits a higher molecular weight and lower polydispersity in comparison with LPEI and PEI<sub>max</sub>. On the other hand, LPEI and PEI<sub>max</sub> displayed similar apparent molecular weight and polydispersity, their acylation level being the main measurable difference between the two polymers.

The efficacy of a polymer on the transfection process is commonly based on end-point reporter gene expression levels. We presented here data providing information related to intracellular events such as polyplex attachment to the cell surface and endocytosis. We did not investigate precisely the endocytic pathway involved in the two cell lines but according to the data presented herein, polyplex attachment and endocytosis are not limiting factors under our transfection conditions. Indeed, all of the cells had internalized polyplexes at 1 hpt, indicating that internalization is a rapid and efficient process. Moreover, polyplexes were able to bind more than 98% of the cells within 10 mpt. Polyplexes with higher positive charge might improve cell

uptake by enhancing their electrostatic interactions with the negatively charged glycosaminoglycans present at the cell surface. We did not see a correlation between polyplexes internalization kinetics and their zeta potentials. In fact, polyplexes formed with PEIpro™ at a DNA:PEI ratio of 1:3 (w:w) and LPEI at a ratio of 1:8 exhibit identical zeta potential values. Interestingly, while the maximal amount of internalized PEIpro™-based polyplexes was approximately half of that observed with LPEI and PEImax polyplexes, comparable percentages of BFP-expressing cells were observed. This indicates that the intracellular events following endocytosis that lead to gene expression are more efficient using PEIpro™. It has to be noted that our transfection conditions result in efficient BFP expression in both cell types using the three different PEIs even though they behave differently in terms of “attachment” and “endocytosis”. In fact, at least 58 % and as much as 84 % of HEK293 and CHO cells expressed the BFP transgene. We finally chose three mAbs of interest to be expressed in HEK293 and CHO cells. Despite similar amounts of internalized polyplexes, those made with PEImax resulted in significantly higher mAb productivity (155 to 230 %) compared to LPEI. Noticeably, while endocytosis levels of PEIpro™-based polyplexes were half of that obtained with LPEI (and PEImax), the mAb expression levels were also always higher with PEIpro™ compared to LPEI (110 to 213 %). Overall, CHO and HEK293 cells transfected with PEImax- and PEIpro™-based polyplexes gave better production yields (with a slight benefit for PEImax-based polyplexes) compared to LPEI. Nevertheless, HEK293 cells transfected with PEImax compared to PEIpro™ gave a significant gain with regard to the expression of Palivizumab and B72-3 antibodies. Furthermore, LPEI and PEImax are the most cost-effective polymers compared to PEIpro™.

An additional level of complexity is the variable capacity of one particular PEI to mediate transfection of different cell types [156,184]. One would expect that cells with lower plasmid uptake activity would demonstrate lower level of gene expression. Monitoring polyplexes binding and internalization showed that, for each PEI, the amount of internalized polyplexes was very similar between HEK293 and CHO cells for a given polymer. However, under identical experimental conditions (except for the DNA:PEI ratio), HEK293 cells exhibited 4- to 10-fold higher mAb production yields than CHO cells. Comparison of intrinsic transfectability and productivity of each cell line is complicated by the existence of multiple variables. For

example, the CMV promoter present in the pTT vectors, although relatively strong in both cell types, is much stronger in HEK293 cells and consequently higher transgene expression levels can be obtained [337]. Also, significant improvement in CHO transient gene expression can be achieved through the addition of valproic acid combined with AKT co-transfection and a temperature shift to 32°C 24 hpt [338,339]. Under these conditions, productivities of 200 mg/L for *Trastuzumab* and 280 mg/L for *B72-3* were obtained (data not shown). Additionally, we noticed that the kinetics by which polyplexes enter cells may be an important parameter leading to efficient gene transfer, an observation in accordance with previous results obtained in our laboratory [308]. It is possible that the delayed endocytosis of polyplexes observed in CHO cells is somehow linked to the internalization pathway(s) leading to their cytoplasmic sequestration, thus limiting transfection efficacy [104].

## Conclusion

Both HEK293 and CHO cell lines are widely used for the transient production of research-grade r-proteins. Besides, the generation of stable CHO cell lines is still often used as TGE does not always meet the required productivities. Optimizing the transfection process to allow for higher r-protein productivities is thus desirable. The proper selection of the transfection reagent represents an easy parameter to optimize and may have significant impact on TGE process. PEI<sub>max</sub> and, to a lesser extent, PEI<sub>pro</sub><sup>TM</sup> are more deacylated than LPEI according our <sup>1</sup>H-NMR analysis. The use of PEI<sub>max</sub> or PEI<sub>pro</sub><sup>TM</sup> polymers to transiently transfect HEK293 and CHO cells clearly provide increased productivities compared to LPEI. Since size-exclusion chromatography experiment reveals that PEI<sub>max</sub> and LPEI exhibit the same apparent molecular size, deacylation may be responsible for the enhanced transfection efficiency observed with PEI<sub>max</sub>. As for PEI<sub>pro</sub><sup>TM</sup>, its higher apparent molecular weight and/or increased monodispersity, combined with its low acylation level, may explain why this polymer is more efficient (similar productivities compared to PEI<sub>max</sub> but with half of internalized polyplexes). When using optimal DNA:PEI ratios, the resulting polyplexes are positively charged and their size range (< 100 nm) allows for proper endocytosis. Kinetics of polyplex-attachment / internalization and transgene expression indicate that all HEK293 and CHO cells bind polyplexes within 10 mpt and internalized them within 1 hpt. Despite a robust BFP transgene

expression was observed for all PEIs, not all cells express the reporter gene after 48 hpt indicating that downstream events limit transfection efficiency. Overall, PEI<sub>max</sub> closely followed by PEI<sub>pro</sub><sup>TM</sup> appears to be the most suitable polymers for TGE in HEK293 and CHO cells as confirmed by the productivity obtained for three monoclonal antibodies. Although these findings demonstrate the importance of determining the most suitable polymers to efficiently transfect CHO and HEK293 cells, further improvements of TGE would require the elucidation of the specific receptor(s) / coreceptors(s) / internalization pathway(s) that leads to an efficient DNA delivery into their nucleus.

## Supplemental Data

*Tableau 3 : Hydrodynamic diameter (nm) and zeta potential (mV) of polyplexes.*

Sample	PEI (μg)	Polyplex Size (nm)	Zeta Potential (mV)
LPEI	3	86.7 ± 2.9	27.8 ± 0.6
LPEI	8	86.1 ± 2.9	32.3 ± 0.5
PEI <sub>Max</sub>	3	75.0 ± 3.9	28.8 ± 2.0
PEI <sub>Max</sub>	5	69.0 ± 6.3	29.7 ± 0.9
PEI <sub>pro</sub>	1	90.3 ± 5.2	22.3 ± 3.6
PEI <sub>pro</sub>	3	82.2 ± 6.6	32.2 ± 0.1

Polyplex size and/or surface charge may affect their uptake by the cells and as such explain the dissimilarities in transfection potential between the three PEIs observed. The effective diameters (Z-average) and surface charges (zeta potential) of the various polyplexes formed at their optimum DNA:PEI transfection weight ratios were measured by dynamic light scattering. Polyplexes were formed with 1 μg of plasmid DNA in 150 mM NaCl at pH 7.4. Hydrodynamic diameter and zeta potential measurements were performed after 10 minutes of incubation and carried out on a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Ltd.) in automatic mode using Zetasizer software. Three measurements, each consisting of 10 runs, were performed at 25°C. Hydrodynamic diameter and zeta potential were extracted from collected photons data with the CONTIN and the Smoluchowsky's methods respectively. All PEIs produced highly compacted

polyplexes with average diameters of 69.0 to 90.3 nm. At the DNA:PEI weight ratio of 1:3, PEI“Max” and PEIpro formed smaller polyplexes than LPEI. This suggests that fully deacylated PEI“Max” or PEIpro<sup>TM</sup> polymers lead to formation of more tightly packed polyplexes. At this DNA:PEI weight ratio of 1:3, a slight increase in surface charge was observed compared to LPEI, PEIpro<sup>TM</sup> having the highest zeta potential ( $32.2 \pm 0.1$  mV).

Data presented hereafter are related to Fig. 28 (antibody expression following transfection with PEIs) and indicates total cell density (left panels) and viability (right panels) of HEK293 and CHO cells transfected with the three different PEIs.

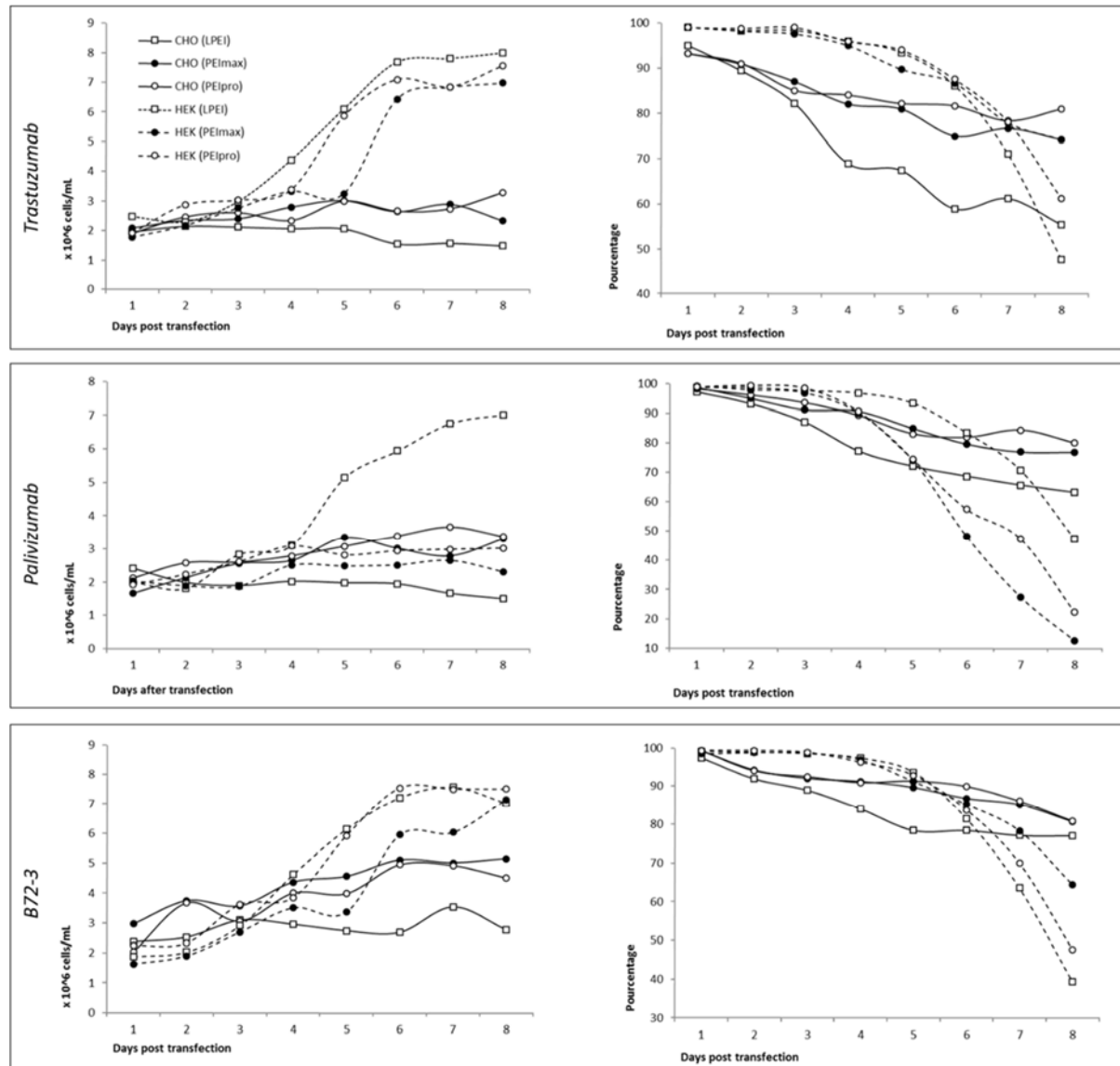


Figure 30 : Total cell density and viability of cultures producing monoclonal antibodies following transfection with PEIs.

## **Data in Brief: Physicochemical Properties of LPEI 25 kDa, PEI“Max” 40 kDa and PEIpro<sup>TM</sup>**

### **Abstract**

The data presented in this article [335] are related to the research article entitled “Comparative study of polyethylenimines for transient gene expression in mammalian HEK293 and CHO cells” [53]. Polyethylenimine is a cationic polymer whose linear form has been described as the most efficient to transfect a wide range of cell lines and thus is broadly used in transient gene expression. Data presented in this article compares apparent size and polydispersity as determined by size exclusion chromatography of three commercially available linear PEIs, namely LPEI, PEI“Max” and PEIpro<sup>TM</sup>. Impact of those features on plasmid DNA affinity was established by plasmid DNA agarose gel migration assay.

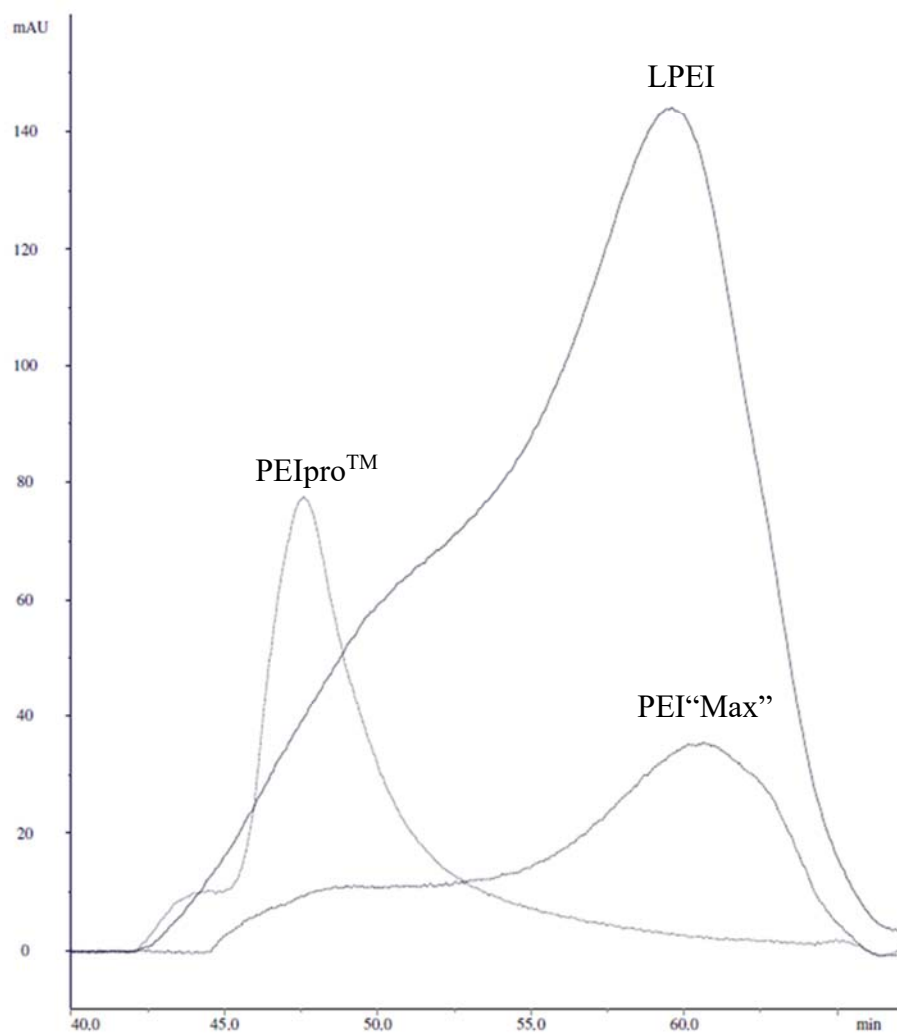
### **Value of the Data**

- This is the first report comparing the apparent size of the LPEI 25 kDa, PEI“Max” and PEIpro<sup>TM</sup> polymers
- Data provide qualitative evidence on the degree of acylation and polydispersity of LPEI 25 kDa, PEI“Max” and PEIpro<sup>TM</sup> polymers
- Data indicates that PEIpro<sup>TM</sup> is the most effective to condense DNA compared to LPEI and PEI“Max” at physiological pH.

### **Data**

PEIs are widely used to introduce a gene of interest into mammalian cells [117]. The data presented in this article includes size exclusion chromatography (SEC) and DNA affinity of three different linear polyethylenimines (PEIs), namely LPEI, PEI“Max” and PEIpro<sup>TM</sup> that are commercially available. We have shown that PEI“Max” and PEIpro are more efficient than LPEI to transfect HEK293 and CHO cells [335]. Polydispersities and apparent sizes of LPEI, PEI“Max” and PEIpro<sup>TM</sup> were assessed by SEC (figure 31). Thanks to their net positive charges, PEIs are able to condense plasmid DNA (pDNA) and their respective pDNA affinity were compared (figure 32).





*Figure 31 : Size Exclusion Chromatography of LPEI 25kDa, PEI‘Max’ 40kDa (hydrochloride salt) and PEIpro™.*

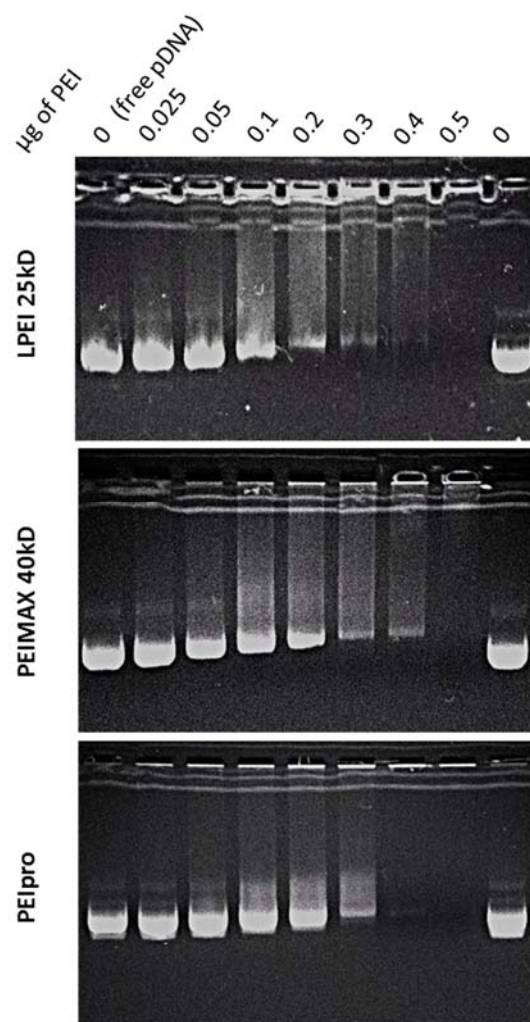


Figure 32 : DNA condensation ability of polyethylenimines.

## Experimental Design, Materials and Methods

### *Size Exclusion Chromatography*

Size exclusion chromatography (SEC) was performed on the liquid chromatograph GE ÄKTA explorer (Amersham Pharmacia) consisting from automated sample injector (loop, 0.5mL), detector UV-900 (GE Healthcare Life Sciences), degasser of eluent and a chromatographic columns (Superdex\_200\_10/300\_GL from GE Healthcare Life Sciences, Cat.17-5175-01). SEC analysis was performed at room temperature using PBS as liquid phase. A volume of 0.5 mL of each PEI solution was injected and signals were recorded at a wavelength of 214 nm. Fractions of 0.5 mL were collected at a flow rate of 0.5 mL per minute.

The size and polydispersity of a linear polyethylenimine (PEI) are critical parameters that influence buffering capacity, ability to condense plasmid DNA and cytotoxicity [119,127,139,142]. According to manufacturer's product description, LPEI and PEI"Max" (Polyscience, Inc.) exhibit a molecular weight of 25 kDa (non-hydrochloride salt form). However, the size of PEIpro<sup>TM</sup> (Polyplus Transfection) is not disclosed by the manufacturer. Data presented here provide qualitative information about the apparent size of the three commercially available PEIs. Propionyl groups present on the polymer chain can be detected at 214 nm and the resulting UV chromatogram following size exclusion chromatography is shown in figure 31. Data indicated that LPEI and PEI"Max" exhibit the same size and polydispersity whereas PEIpro<sup>TM</sup> is significantly less polydisperse and elutes from the column with an higher apparent size. To allow the detection of fully deacylated polymer (absence of N-propionyl side chains) that would not absorb at 214 nm, an acid azo Orange II dye assay [340] was performed on each fraction and confirmed that the data showed in figure 31 are representative of the complete profile of each polyethylenimine. Moreover, as the intensity of the UV signals (integration of the surface under the curve) presented in figure 31 depends on the degree of acylation (presence of N-propionyl side chains), it also indicates that LPEI is the most acylated polymer whereas PEI"Max" and PEIpro<sup>TM</sup> are the least acylated.

### *Plasmid DNA Affinity*

For DNA gel retardation assay, increasing amounts of PEIs and 0.7 µg of pTT-SEAP DNA were each diluted in 10 µL final volume of F17 medium and vortexed. The diluted PEI was added to the DNA solution and the resulting mixture was gently vortexed. After 10 minutes incubation at room temperature (RT), the complex mixture was loaded onto a 1% (w/v) agarose gel. Electrophoresis was carried out in a Tris-acetate-EDTA (TAE) pH 7.4 running buffer solution. Visualization of DNA was performed using an Image Station 440 (Kodak Digital Science).

Agarose gel retardation electrophoresis was performed to evaluate the DNA condensation ability of the PEIs (figure 32). The polyplexes were prepared with plasmid DNA at DNA:PEI ratios ranging from 0 to 0.5 (w:w) in 150 mM NaCl pH 7.4 and incubated for 10 minutes at RT. Polyplex suspensions containing 0.7 µg of DNA were electrophoresed on 1% agarose gels in 1X TAE running buffer pH 7.4 at 200 V for 20 minutes. The migration of complexed DNA on agarose gel was compared to that of naked pDNA. Data show that the migration of the DNA was progressively retarded with larger amounts of polymers, indicating an increasing complexation with PEI and progressive neutralization of negative phosphate charges. An increase in complex size might also explain the DNA retardation phenomenon. PEIpro<sup>TM</sup> almost completely complexed DNA with no observable streak at a DNA:PEI ratio of 1:0.4 (w:w) while this ratio was of 1:0.5 for LPEI and PEI“Max”. No DNA migration were observed at DNA:PEIs ratio superior to 1:0.5 (data not shown) meaning that DNA were fully complexed by all three PEIs.

## **Chapitre 3 : Le Cheminement Intracellulaire des Polyplexes liés au Syndécan 1**

Dans cette étude nous avons démontré que le syndécan-1 (SDC1) est un des récepteurs potentiels des polyplexes à base de PEI, étudié les différentes voies d'internalisation des complexes polyplexe / SDC1, et caractérisé leur cheminement intracellulaire dans les cellules HEK293. Pour ce faire, une lignée cellulaire HEK293 exprimant de manière stable le SDC1 en fusion à la protéine fluorescente GFP a été générée. Le polyéthylèneimine a été marqué avec le colorant fluorescent rhodamine B isothiocyanate (RITC, 544/576) qui possède une forte affinité pour les groupements amines arborant une charge neutre. L'ADN plasmidique, quant à lui, a été marqué grâce à l'agent intercalant TOTO-3 (642/660). Cette méthode a permis de visualiser en microscopie confocale l'évolution des complexes dans les cellules HEK293. L'étude se base principalement (mais pas seulement) sur deux techniques : la cytométrie en flux et la microscopie confocale. Cette dernière est une technique d'analyse qualitative c'est pourquoi nous avons prêté une attention particulière au nombre de cellules observées et analysées. A la suite de nos observations, nous avons été en mesure de proposer un modèle de l'endocytose des polyplexes et du trafic intracellulaire des complexes polyplexe / SDC1 dans les cellules HEK293 (Fig. 44).

### **Intracellular Trafficking of Polyethylenimine/Syndecan-1 Complexes in HEK293 Cells**

#### **Abstract**

Among the polycationic delivery vectors, polyethylenimines (PEIs) are widely used to efficiently transfect mammalian cells both *in vitro* and *in vivo*. Although evidence of the involvement of glycosaminoglycans (GAGs) in the uptake of PEI-DNA complexes (polyplexes) was reported long ago, the membrane receptor(s) responsible for polyplexes uptake remain to be clearly identified. Furthermore, little is known about the intracellular routing of polyplexes following their uptake. We have shown that syndecan-1 (SDC1) may act as a membrane receptor

for polyplexes. Here, we explored the intracellular fate of polyplex/SDC1 complexes over time. Shortly after transfection, SDC1 forms clusters colocalizing with polyplexes that are rapidly endocytosed. Only a small proportion of the resulting endosomes are addressed to the lysosomes while most of the polyplex/SDC1 complexes colocalize with the trans-Golgi network (TGN) within 3h post-transfection. Between 3 to 6 h post-transfection, TGN-localized polyplexes dissociate from SDC1. Finally, SDC1 is degraded and polyplexes accumulate in the cytoplasm as large aggregates. Taken together, these results give new insights into the intracellular trafficking of SDC1 and polyplexes following PEI-mediated transfection.

**Key words:** Trans-Golgi network, Endocytic pathway, Intracellular trafficking, Polyethylenimine, Syndecan-1, Transfection

## **Introduction**

Since its discovery, gene transfer resulting in transient exogenous gene expression has become an invaluable technique in cell biology research. Gene transfer can be used to produce recombinant proteins for fundamental and industrial purposes, to study gene function and its regulation, and to establish various disease models. Non-viral gene transfer technology also represents a major field of research and development for gene therapy applications. A better mechanistic understanding in the area of non-viral gene delivery have been the subject of investigation in order to improve transient exogenous gene expression while limiting side effects such as cytotoxicity [341,342]. However, key biological phenomena including a better understanding of how polyplexes bind to cells, endocytose and reach the nucleus is still remain poorly defined.

Polyethylenimines (PEIs) and their derivatives are among the most studied and widely used non-viral carriers to deliver DNA to cells [83,343]. They are cationic polymers that condense and protect the nucleic acid cargo forming positively charged polyplexes. Their capacity to transfect cells was demonstrated for the first time twenty years ago by Boussif et al. [117]. From that point on, the interest for these non-viral carriers as a safe alternative to viral approaches never stopped growing [341,344,345]. In fact, the 25-kDa linear (LPEI) and branched (BPEI) PEI polymers were shown to be among the most efficient non-viral DNA carriers for *in vitro*

and *in vivo* gene delivery [144,346,347] and are the subject of intense research for gene therapy [118,119,348,349] and for large-scale transfection applications [16,318].

One characteristic of PEIs is their considerable buffering capacity (also known as proton sponge effect), thought to cause the rupture of the lysosomal membrane with subsequent release of polyplexes into the cytoplasm [117,122,198]. This is then followed by their nuclear entry, likely during mitosis when the nuclear membrane temporarily breaks down [202,350,351]. Remarkably, despite the fact that cellular binding, endocytosis and routing of polyplexes to the nucleus are critical steps for efficient gene delivery and expression, these mechanisms remain largely misunderstood. This is complicated by the fact that these pathways may differ from one cell line to another [124], underlying a potential source of experimental variability observed between laboratories [302]. It has been suggested that gene transfer by cationic carriers is mediated via cell-surface proteoglycans (PGs) both *in vitro* and *in vivo* [178,300,307]. A net positive surface charge of polyplexes is thus generally considered as prerequisite for their cellular uptake as interactions between the anionic cell surface PGs and cationic polyplexes are thought to promote their uptake by the cell. Cationic complexes are known to penetrate into cells mainly by endocytosis [156,174], but the specific cell surface receptors that trigger their endocytosis are not well characterized, it has been proposed that the anionic membrane-associated heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) family, which includes a wide variety of proteins with numerous biological functions, could act as receptors for the positively charged polyplexes [300,301,305]. More specifically, the syndecans (SDCs) family of HSPGs, which are particularly abundant at the surface of many cells [251,352,353], could potentially act as membrane receptors for polyplexes. It has been hypothesized that SDC1 could act as such receptor [305] and previous studies provided evidences that this is indeed the case [303,308].

Here, we demonstrate that addition of BPEI-DNA complexes to SDC1-expressing cells rapidly and efficiently induces clustering and endocytosis of SDC1 via lipid rafts, amongst other things. Confocal microscopy analysis revealed that polyplexes extensively colocalize with SDC1. We then explored the intracellular fate of polyplex/SDC1 complexes over time and showed that only a few polyplex/SDC1- containing endosomes are targeted to lysosomes but rather these are extensively and rapidly (within 3h) addressed to the trans-Golgi network (TGN). Polyplexes

then appear to dissociate from SDC1 within the TGN compartment, and SDC1 gets degraded. Polyplexes are finally released into the cytoplasm where they ultimately form large aggregates that will remain several days post-transfection. This study thus shed some light on BPEI-mediated gene delivery mechanisms and provides new information on polycation-mediated SDC1 internalization and intracellular routing.

## **Materials and Methods**

### **Reagents**

The following reagents were used: 293Fectin (Invitrogen); Hoechst 33342, Rhodamine B isothiocyanate (RITC), Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD), branched 25-kDa PEI (BPEI), cycloheximide, paraformaldehyde (Sigma-Aldrich); restrictions enzymes and Vent DNA polymerase (New England BioLabs); cholera toxin B-Alexa 594, CellLight® Lysosomes-RFP, Bacmam 2.0, TOTO®-3 Iodide (ThermoFisher Scientific).

### **Vector Construction**

Full-length SDC1 was amplified using forward (5' - CTAGGATCCACCATGAGACGCGCGG - 3') and reverse (5' - CAAGCTAAGCGGCGTAGAACTCCTC - 3') primers and subcloned in frame with GFP cDNA (superglo GFP, Q-Biogene) in pYD10-GFP vector (pTT5 vector with a blasticidin resistance cassette) digested with BamHI and NheI. The plasmid DNA encoding for TGN38-CFP fusion protein [354] was modified by replacing the cyan fluorescent protein (CFP) cDNA by a monomeric red fluorescent protein 1 (mRFP1) [355] cDNA following NotI and AclI digestion.

### **Labeling of PEI and Plasmid DNA**

BPEI was labeled with RITC enabling its rapid detection and localization. Briefly, BPEI (6 mg/ml) in bicarbonate buffer (0.1M, pH 8.94) was mixed with 1 ml of RITC previously dissolved in DMSO at a concentration of 1 mg/ml, and incubated at room temperature on a shaker overnight. The unbound RITC was removed by running the mixture on a Sephadex G25 column (Bio-Rad). A ratio of 17:1, DNA base pairs to dye molecules were used to stain the



pTT5-BFP vector with TOTO®-3 Iodide dye by mixing 50 µg of plasmid DNA to the dye solution followed by an incubation of 1 hour in the dark at room temperature.

### **Cell Culture and Transfection**

HEK293 cells were maintained in FreeStyle 293 Expression Medium, supplemented with 0.1% Pluronic F-68 and 50 µg/ml geneticin G418. For stable SDC1 expression,  $1 \times 10^6$  cells/ml were transfected essentially as previously described [322] : BPEI/DNA complexes (polyplexes) were prepared by adding 2 µg of branched PEI to 1 µg of pYD10-SDC1/GFP vector, both diluted in 100 µl of Freestyle 293. Solutions were mixed, vortexed, and incubated at room temperature for 15 min before their addition dropwise to the culture. After 48 h, the medium was replaced by fresh medium supplemented with 2 µg/ml of blasticidin for several weeks. Then, a bulk of blasticidin resistant cells stably expressing SDC1/GFP was obtained following fluorescent activated cell sorting (now on referred as 293-SDC1 cells). For transient expression of Rab11-DsRed (Addgene plasmid 12679; [356]) and TGN38-mRFP1, 293-SDC1 cells were transfected using 293Fectin procedure according to manufacturer's instructions. Three days post-transfection,  $2 \times 10^6$  293-SDC1 cells were transfected using TOTO3-labeled pDNA and BPEI (for flow cytometry analysis) or RITC-labeled BPEI (for confocal microscopy analysis) as follows: BPEI/DNA complexes were prepared by adding 1.5 µg of BPEI or 4.5 µg of RITC-labeled BPEI to 1 µg of DNA (TOTO3-labeled pTT5-BFP), both diluted in 100 µl of Freestyle 293 (supplemental data, Fig. 33). Solutions were mixed, vortexed, and incubated at room temperature for 10 min before their addition to the cell culture.

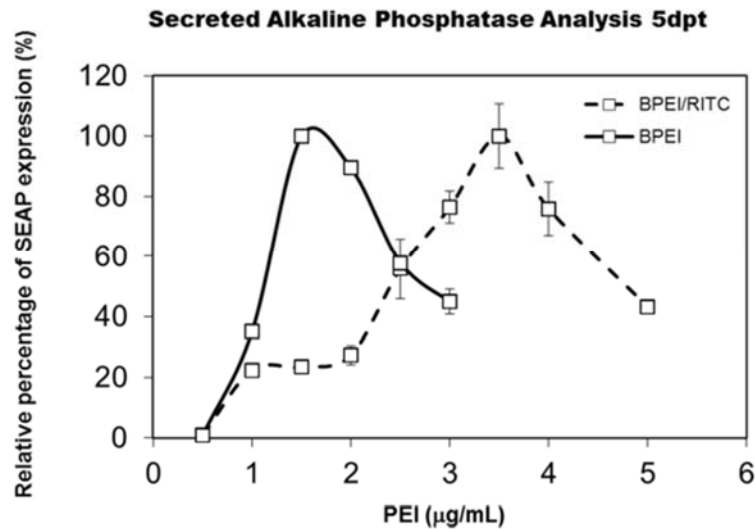
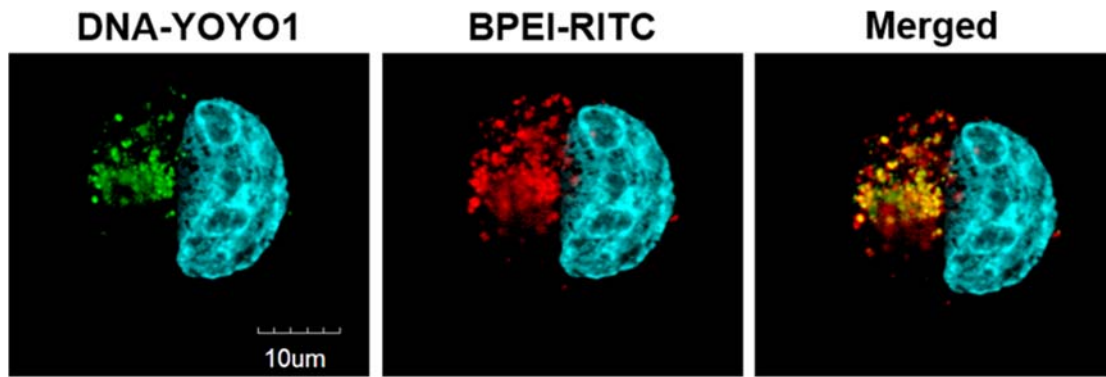


Figure 33 : Optimization of BPEI / pDNA (w/w) ratio.

Transfection efficiencies were evaluated using human placental secreted alkaline phosphatase (SEAP) as reporter gene. Increasing quantity of BPEI (RITC labeled or not) were added to 1 µg of pDNA (encoding for SEAP reporter protein) per mL of cell culture. After 5 days following transfection, SEAP were analysed and quantify (method is described in [41]) as seen in lower panel. Relative percentages of SEAP are representative of three individual experiments conducted in triplicate. The absolute SEAP titers obtained with BPEI previously labeled or not were  $197 \pm 18$  and  $135 \pm 2$  mg/mL respectively. HEK293 cells were transfected with RITC-BPEI / pDNA optimal ratio and fixed for 10 min with 4% paraformaldehyde at 1 hpt (higher panel). Determination of Pearson's colocalization coefficient indicated that 89 % of YOYO-1 labeled-pDNA colocalize with

*RITC labeled-BPEI. As anticipated, in these conditions RITC-BPEI can be free (not bound to pDNA) and internalized into HEK293 cells.*

### **Flow Cytometry Analyses**

The percentage of cells expressing both GFP and BFP were measured by flow cytometry using a BD LSR II flow cytometer (BD Biosciences) equipped with four lasers (blue laser 488 nm, red laser 633 nm, violet laser 405 nm and 355 UV laser). Viable transfected cells were quantified by using appropriate gating to exclude dead cells, debris, and aggregates in a forward scatter against side-scatter-plot.

### **Colocalization Experiments and Confocal Microscopy**

Detection of fluorescent proteins, lysosomes, endoplasmic reticulum, CTxB, TOTO3-labeled DNA and RITC-labeled BPEI were performed using a confocal microscope. Cells were plated for 1 h onto poly-d-lysine coated glass bottom 35-mm culture dishes, No. 0 (MatTek). After washing cells with fresh medium, plated-cells were transfected with RITC-BPEI (or unlabeled BPEI when required) for the indicated period of time. Cells were then fixed in PBS containing 4% formaldehyde for 10 min. When applicable, nuclei were stained with 2  $\mu$ g/ml Hoechst 33342 for 10 min. To label lysosomes in SDC1-positive HEK293 cells, CellLight lysosomes-RFP Bacmam solution was added to cells according to manufacturer's instructions. For CTxB staining, 293-SDC1 cells were put at 4°C to prevent endocytosis. Prior to polyplexes addition, 1  $\mu$ g/ml of CTxB Alexa Fluor 594 conjugate was added to cells, and then Petri dishes were put back at 37°C. To deplete membrane cholesterol, 293-SDC1 cells were treated for 1 h with increasing concentrations of M $\beta$ CD. Then, cells were transfected as described above with polyplexes containing a BFP coding vector.

Fluorescence images and time-lapse microscopy were analyzed by confocal microscopy (Fluoview<sup>TM</sup> FV10i, Olympus) using UPLSAPO-equivalent Olympus 60X (NA 1.35) objective. The confocal microscope was equipped with four wavelength diode lasers (405/473/559/635 nm). For RFP detection, a laser diode (excitation: 559 nm) and a BP filter (570-620 nm) were used to capture the signal; a laser diode (excitation: 495 nm) and a BP filter (519 nm) were used to capture the signal recorded as green. The TOTO3 signal was recorded using a laser diode

(excitation: 642 nm) and a BP filter (661 nm). Finally, the RITC-labeled BPEI signal was recorded using a laser diode (excitation: 552 nm) and a BP filter (578 nm). Olympus original software and Volocity 6.3 analysis software were used for image acquisition and processing, respectively.

### **Transmission Electron Microscopy**

For electron microscopy transfected 293-SDC1 cells were fixed at indicated time after transfection as described by Ito and Karnovski [358], dehydrated and embedded in Epon according to standard procedures and analyzed on a *Philips EM410* transmission electron microscope operated at 80kV.

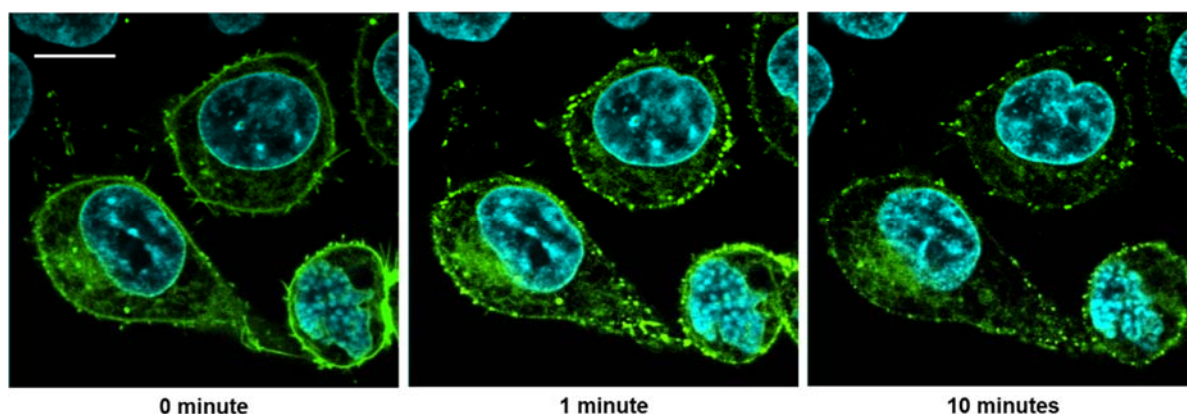
### **Online Supplemental Material**

Video 1 shows time-lapse formation of SDC1 clusters following polyplexes addition. Video 2 is a 3D projection of stacked laser scanning confocal microscope images showing repartition of SDC1 clusters (green) 10 min after polyplexes addition. Video 3 shows SDC1-expressing HEK293 cells without polyplexes addition. Video 4 shows CD4-expressing HEK293 cells following polyplexes addition. Nucleus appears in blue. Optimization of the BPEI / pDNA ratio using human secreted alkaline phosphatase (SEAP) as reporter gene [357] is presented in supplemental data presented in Fig. 33). Supplemental data presented in figure 43 displays that polyplexes can also be internalized by the cells via the macropinocytosis mechanisms.

## **Results**

### **Polyplexes Induce Clustering and Endocytosis of SDC1**

To follow the redistribution of SDC1 after polyplexes addition, a recombinant construct in which SDC1 was fused in-frame with GFP at its C-terminal end was stably expressed in HEK293 cells. A fluorescence-activated cell sorting (FACS)-enriched population of SDC1/GFP-expressing cells (74±3% of the total population) was used throughout this study. Confocal and time-laps microscopy analysis revealed that clustering of SDC1 at the cell surface could be observed within 1 min after polyplexes addition (Fig. 34, Video 1, Video 2).

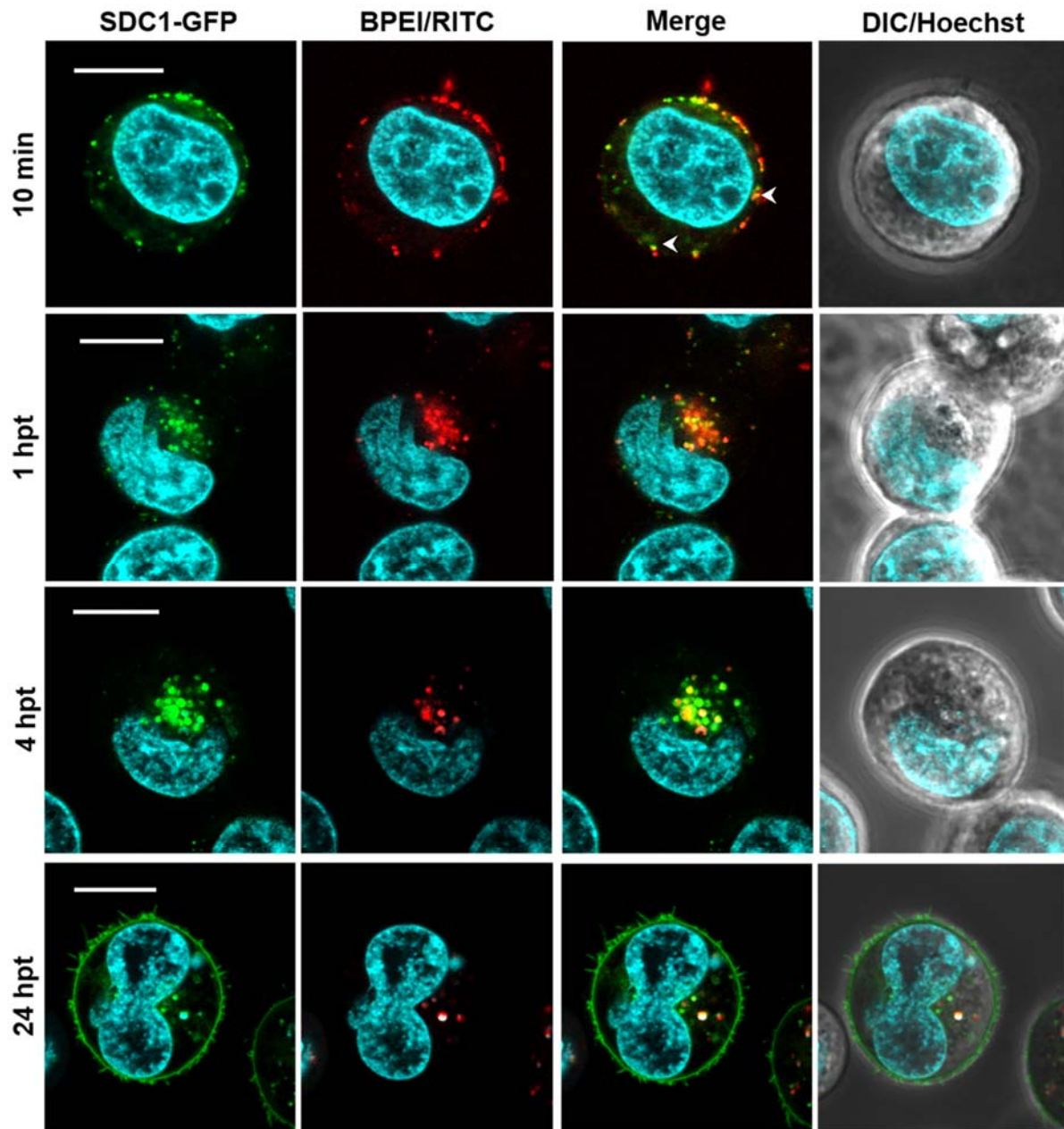


*Figure 34 : Polyplexes addition induces the formation of SDC1 clusters.*

*HEK293 cells stably expressing SDC1/GFP (green) protein were plated for 1 h on MatTek 3.5-mm Petri dishes and the nucleus were labeled with Hoechst 33342 (cyan). Pictures were then taken before and at 1 or 10 minutes following the addition of polyplexes. Bar, 10  $\mu$ m.*

Moreover, behavior of SDC1-expressing HEK293 cells in the absence of added polyplexes (Video 3) or HEK293 cells stably expressing an irrelevant GFP fusion protein (CD4-GFP) following polyplexes addition (Video 4) confirmed that SDC1 clustering is a phenomenon specifically induced by the addition of polyplexes. Moreover, at 10 min post-transfection (mpt), confocal microscopy analyses show that SDC1 clusters colocalize to a great extent with RITC-labeled (BPEI) polyplexes. Indeed, Pearson's coefficient quantification (Volocity software) indicated that  $75 \pm 1$  % of BPEI/RITC based polyplexes colocalize with SDC1/GFP. At 10 mpt, the majority of resulting polyplex/SDC1 complexes are heterogeneously distributed around the cell membrane with a small number of these complexes appear to be already endocytosed (Fig. 35, see arrows). At 1-hour post-transfection (hpt), most of the endocytosed polyplex/SDC1 complexes could be found packed into an area close to the nucleus (Fig. 35). At 4 hpt, the number of polyplex/SDC1-containing endosomes dropped dramatically when compared to 1 hpt, while many SDC1-free polyplexes can be observed. Larger vesicles were detected suggesting fusion of SDC1-endosomes (Fig. 35). At 24 hpt, very few SDC1 clusters could be found within cells while polyplexes are still detectable (Fig. 35). Altogether, and in agreement with previous study conducted in our laboratory [308], these results demonstrate that polyplexes

efficiently trigger clustering and endocytosis of SDC1, suggesting that SDC1 may act as a membrane receptor for polyplexes.



*Figure 35 : Polyplexes-SDC1 complexes progress after endocytosis.*

*HEK293 cells stably expressing SDC1/GFP (green) were plated for 1 h on MatTek 3.5-mm Petri dishes and transfected with RITC-labeled PEI (red)-DNA complexes. Prior to transfection, nuclei*

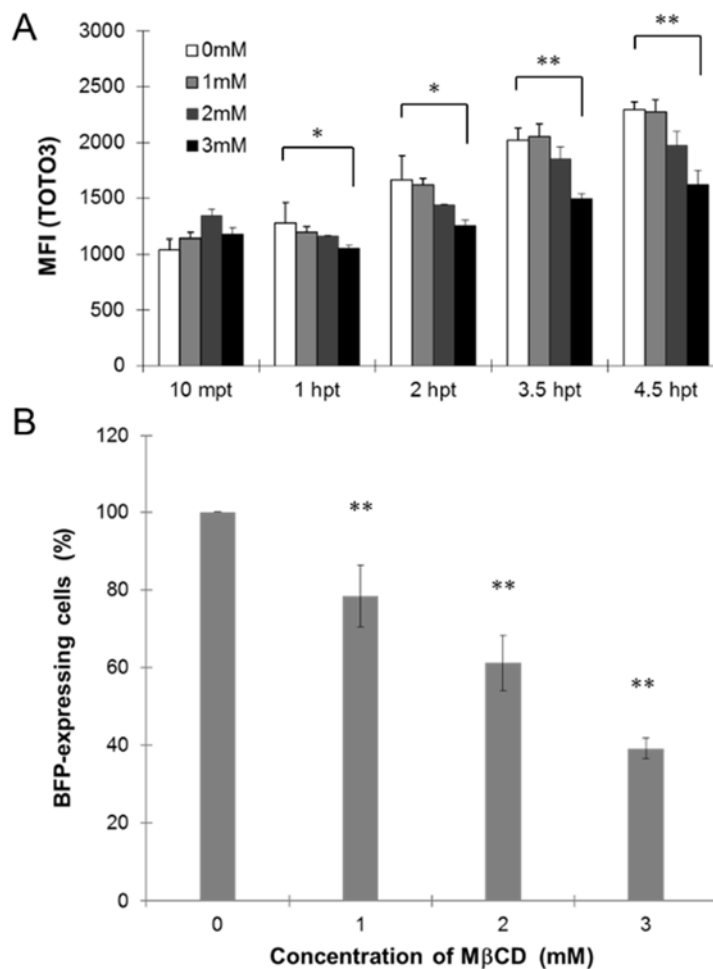
*were stained with Hoechst 33342 (cyan). At the indicated period of time, cells were fixed for 10 min by 4% paraformaldehyde and analyzed by confocal microscopy. This figure is representative of two individual experiments in which a number of 18 cells were analysed. Bars, 10  $\mu$ m.*

### **Polyplex/SDC1 Complexes are Endocytosed via Lipid Rafts and Clathrin-dependent Pathway**

Several studies have demonstrated that PEI could be endocytosed by clathrin-dependent and/or independent mechanisms involving lipids rafts [178,184,185,359] and that the path taken for efficient gene expression is largely cell line dependant [156]. To tackle this issue in HEK293 cells, we looked for the effect of internalization pathway inhibitors. We treated 293-SDC1 cells for 1h with increasing concentrations of methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD), which depletes the cholesterol required for lipids rafts integrity and function [360], followed by transfection with polyplexes containing the pTT-BFP encoding vector which was labeled with TOTO3 dye. The flow cytometry analyses of polyplexes containing TOTO3 labeled-pDNA (between 1 hpt and 4.5 hpt) indicated a significant decrease in polyplex attachment and internalization when cells were treated with M $\beta$ CD (Fig. 36A). At 48 hpt, the percentage of double fluorescent cells (green for SDC1 and blue for BFP-expressing cells) were also analyzed by flow cytometry. A significant reduction in cell transfection efficiency (up to 60% at 3 mM M $\beta$ CD) was observed (Fig. 36B), indicating that in HEK293 cells, lipids rafts are involved in polyplexes endocytosis leading to gene expression.

The cholera toxin B subunit (CTxB) binds to glycosphingolipids GM1 at the cell surface and is frequently used as a probe to detect lipid rafts, a microdomain of the plasma membrane enriched in cholesterol [361]. Confocal microscopy analyses performed 1 hpt clearly show that CTxB does colocalize to a large extent with endosomes containing SDC1-GFP associated with TOTO-3 labeled plasmid DNA (Fig. 37), indicating that polyplex/SDC1 complexes are mainly endocytosed via lipid rafts in HEK293 cells. This observation is confirmed in two independent experiments which reveal colocalization of CTxB fluorescence and SDC1/GFP (Mander's coefficient of  $0.92 \pm 0.05$ ; 1 = perfect colocalization) and DNA/TOTO3 (Mander's coefficient of  $0.97 \pm 0.03$ ) fluorescence.

It was previously reported that the depletion of potassium ( $K^+$ ) prevents clathrin-dependent endocytosis [362]. In stark contrast with the effect of M $\beta$ CD,  $K^+$ -depletion has no influence on polyplexes attachment and / or endocytosis (Fig. 38A). However, analysis of gene transfection at 48 hpt by flow cytometry indicated a strong reduction in the percentage of double fluorescent cells ( $\geq 70\%$ , Fig. 38B) as illustrated by fluorescence microscopy images (Fig. 38C), suggesting that gene expression-competent polyplexes are also endocytosed via the clathrin-dependent pathway.

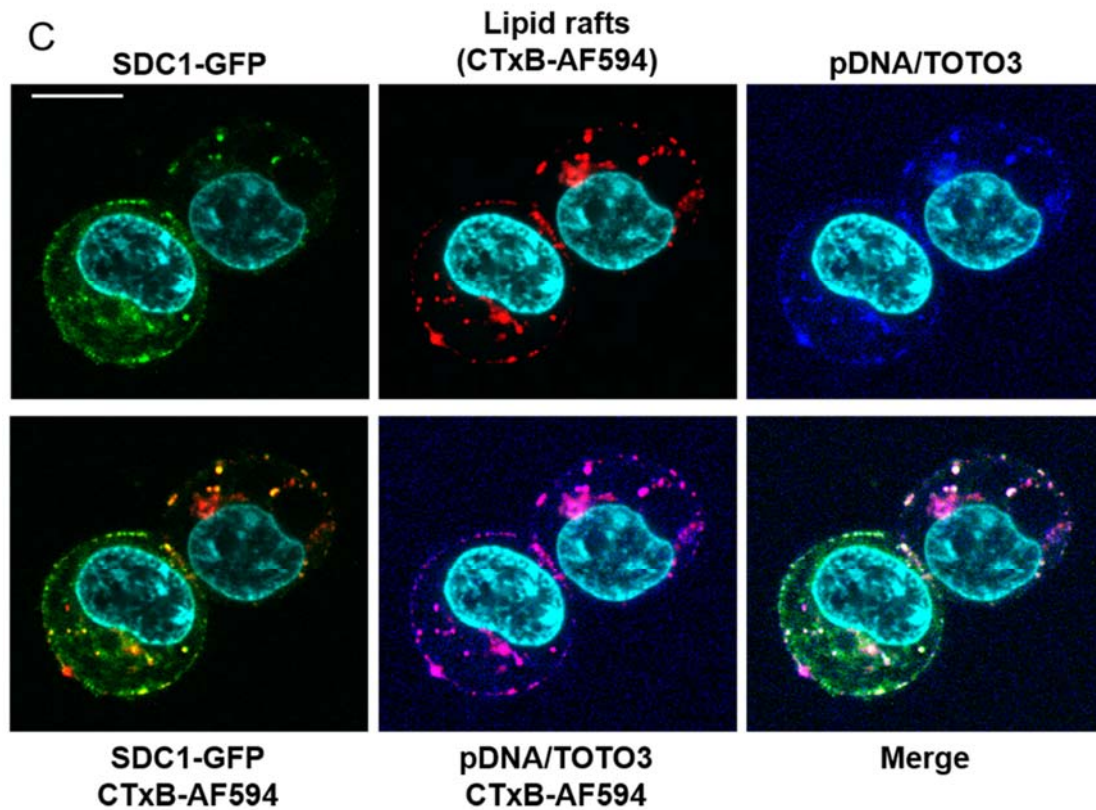


*Figure 36 : Polyplex/SDC1 complexes are endocytosed via lipid rafts.*

*To determine the role of lipid rafts in PEI-mediated transfection, membrane cholesterol was depleted following the addition of increasing concentrations of methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD). After 1 h of*

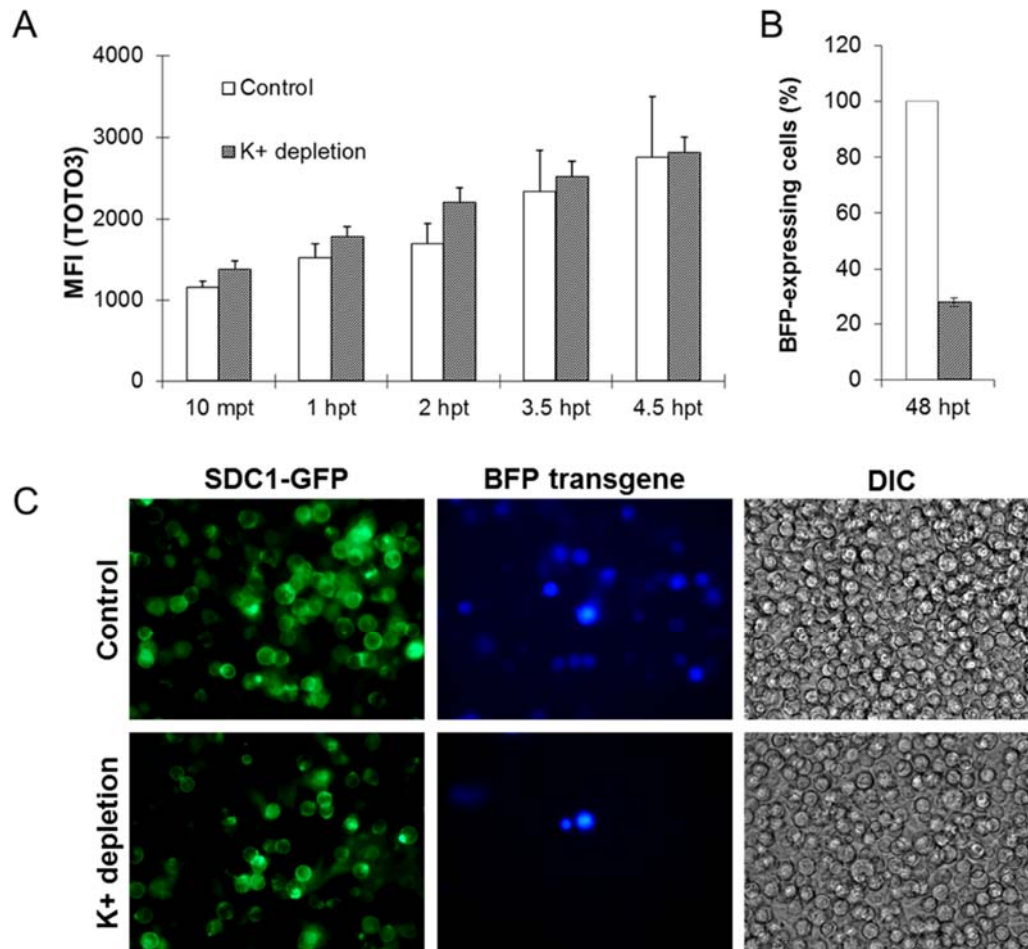


treatment, M $\beta$ CD-treated cells were transfected with polyplexes containing a vector coding for the BFP. (A) At indicated time after transfection, the mean fluorescence intensity of TOTO3-labeled plasmid DNA was determined by flow cytometry and reflects attachment and internalization of polyplexes. (B) At 48 hpt, the percentage of double fluorescent cells (green for SDC1 and blue for transfected cells) was measured. Results are expressed relative to untreated cells, considered as 100%. Data are means  $\pm$  SD (error bars) of triplicates and representative of two independent experiments.



**Figure 37 : Colocalization of polyplex/SDC1 complexes with cholera toxin B.**  
The colocalization of polyplexes with lipid rafts was assessed by means of cholera toxin B (CTxB, red) and SDC1/GFP-expressing cells (green) plated for 1 h on MatTek 3.5-mm Petri dishes. To prevent endocytosis, cells were placed at 4°C. Prior to polyplexes addition, 1  $\mu$ g/ml of CTxB Alexa Fluor 594 conjugate was added to cells, and then Petri dishes were put back at 37°C. At 1 hpt, cells were fixed for 10 min with 4% paraformaldehyde and analyzed by confocal microscopy.

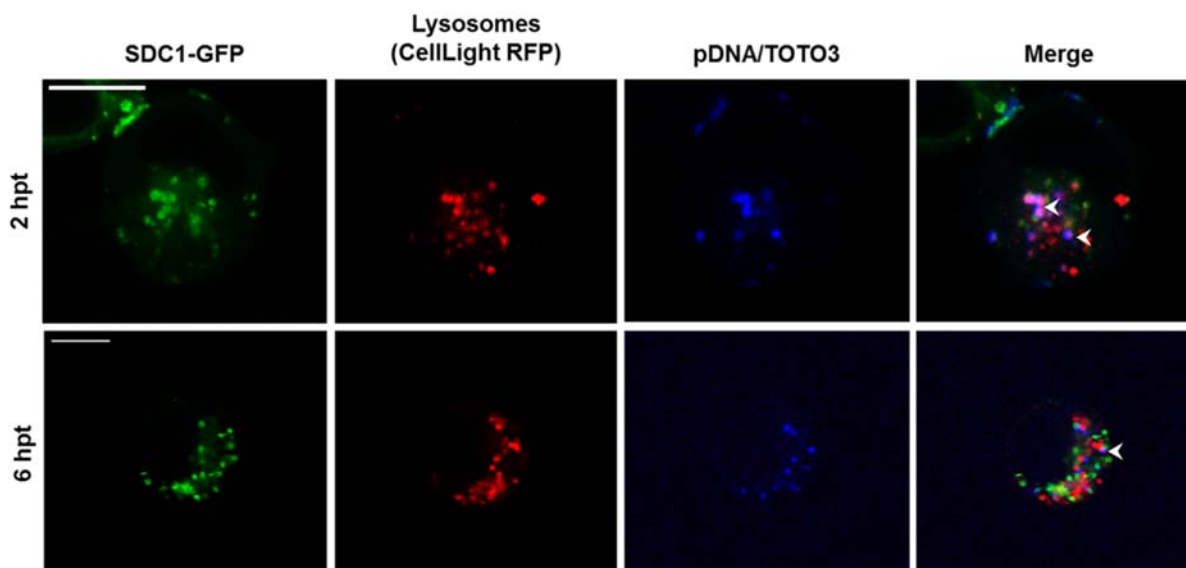
*Nuclei (cyan) were stained using Hoechst 33342 prior to transfection. This figure is representative of two individual experiments in which a number of 20 cells were analysed. Bar, 10  $\mu$ m.*



*Figure 38 : Implication of clathrin-coated pits in polyplex/SDC1 complexes endocytosis. (A) To assess the role clathrin-dependant pathway during PEI-mediated transfection, HEK293-SDC1 cells were transfected following K<sup>+</sup> depletion combined with incubation in hypertonic medium. At the indicated times after transfection, the mean fluorescence intensity of TOTO3-labeled plasmid DNA was determined by flow cytometry and reflects attachment and internalization of polyplexes. At 48 hpt, transfection efficiency was measured by flow cytometry, then expressed relative to untreated cells (B) and conventional microscopy analyses (C) were performed to visualize BFP transgene expression in 293-SDC1 cells. An exposure time of 2 ms was used.*

## Polyplex/SDC1 Endosomes are Weakly Addressed to Lysosomes but Mainly to the Trans-Golgi Network

It has been previously suggested that PEI, through the proton-sponge effect, induces swelling of lysosomes, resulting in organelle rupture and polyplexes release into the cytoplasm [117,122,196]. It is thus expected that a significant proportion of polyplex/SDC1-containing endosomes will be addressed to lysosomes. Surprisingly, confocal microscopy analyses of cells treated with CellLight™ Lysosomes-RFP (which expresses RFP fused to lysosomal associated membrane protein 1: Lamp1), revealed that only a small number of polyplex/SDC1-endosomes are targeted to lysosomes after 2 hpt, and weak colocalization could be detected at 6 hpt (Fig. 39) with a Mander's colocalization coefficients average of  $0.36 \pm 0.12$  and  $0.19 \pm 0.09$  respectively. Interestingly, at 6 hpt, polyplexes not colocalizing with SDC1 could be observed, suggesting that a partition between polyplexes and SDC1 occurred.

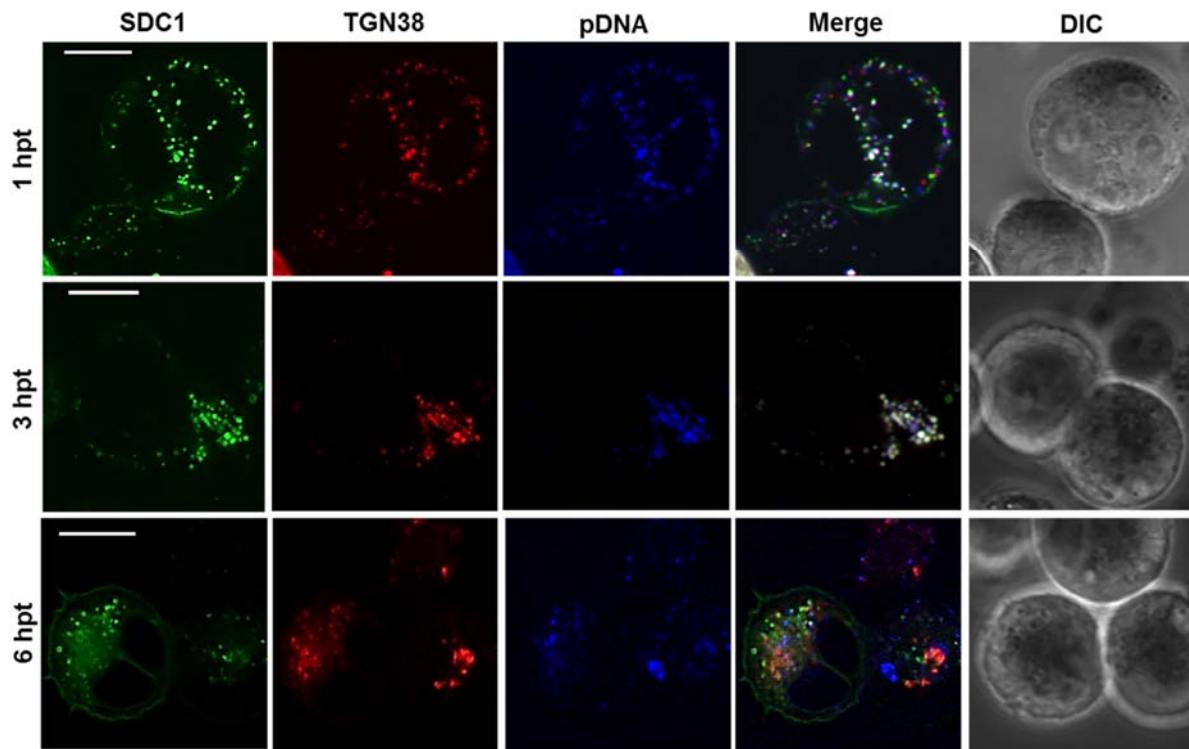


*Figure 39 : Polyplex/SDC1 endosomes partly colocalize with lysosomes.*

*To determine if polyplex/SDC1 endosomes are targeted to lysosomes, the latter were stained using CellLight-Lysosomes-RFP according to manufacturer's instructions. Cell culture medium was replaced 16 hours post-transduction and cells were transfected by polyplexes before plating for 1 h on MatTek 3.5-mm Petri dishes. Cells were then fixed at the indicated periods of time and localization*

of SDC1 (green), polyplexes (blue, TOTO3-labeled DNA) and lysosomes (red) was determined by confocal microscopy analysis. Observations are representative of two individual experiments in which at least ten SDC1-293 cells were analyzed. Bars, 10  $\mu$ m.

We next wanted to determine if the trans-Golgi network (TGN) could be involved in the redistribution of polyplex/SDC1 complexes. To address this, we transiently transfected 293-SDC1 cells with a vector encoding for mRFP1-tagged TGN38, a resident protein of the trans-Golgi network [363]. Confocal microscopy analysis revealed that some polyplex/SDC1 complexes begin to colocalize with TGN38 at 1 hpt, while the majority of them colocalize with TGN38 at 3 hpt (Fig. 40). Similar to the phenomenon observed above with lysosomes, polyplexes not colocalizing with SDC1 nor TGN38 could be observed at 6hpt, suggesting that the partition between polyplexes and SDC1 happens in the trans-Golgi network.



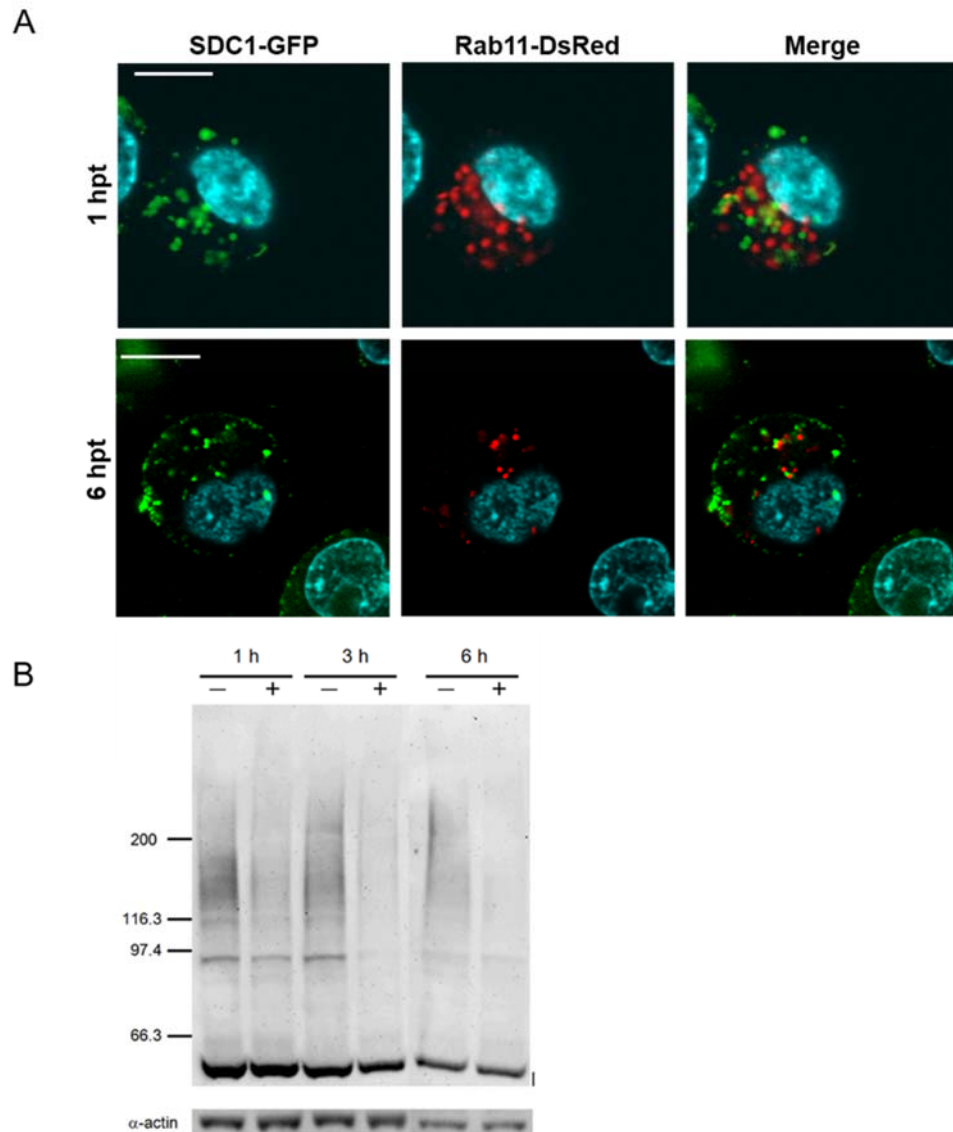
*Figure 40 : Polyplex/SDC1 endosomes mainly colocalize with the trans-Golgi network. To determine if polyplex/SDC1 complexes are addressed to the trans-Golgi network (TGN), SDC1/GFP-expressing cells were transiently transfected by a vector coding for mRFP1-tagged*

*TGN38. At 72 hpt, cell culture medium was replaced and cells were transfected with polyplexes before being plated for 1 h on MatTek 3.5-mm Petri dishes. Subsequently, cells were fixed at indicated times and the localization of SDC1/GFP (green), TGN38 (red) and polyplexes (blue) was assessed by confocal microscopy. Observations are representative of two individual experiments in which at least ten SDC1-293 cells were analyzed. Bars, 10  $\mu$ m.*

### **SDC1 is not Recycled via Rab 11 but Degraded.**

As SDC1 colocalizes with the TGN at 3 hpt and then disappears at 6 hpt, we hypothesized that SDC1 could be recycled at the cell surface after polyplex release. To verify this, we transiently transfected 293-SDC1 cells with a vector encoding for DsRed-tagged Rab11, a small GTPase required for addressing recycling endosomes to cell membrane [364]. Confocal microscopy analysis revealed that SDC1 endosomes do not colocalize at any time with Rab 11 (Fig. 41A), suggesting that SDC1 is not recycled at the cell surface and that it could simply be degraded.

To test if SDC1 is degraded after complexes partition, cells were treated with cycloheximide for 1 h, in order to prevent *de novo* SDC1 synthesis. Then, polyplexes were added or not and cells were lysed. The amount of SDC1 in non-transfected or transfected cells was determined at the indicated times by western blot using an antibody raised against the N-terminus end of SDC1 (Fig. 41B). The western blot result reveals that the amount of mature glycosylated SDC1 rapidly decreases after polyplex addition compared to non-transfected cells. Moreover, the fact that the amount of the 60 kDa SDC1 core protein (non-glycosylated and thus not expected to have yet reached the cell surface) is not significantly modulated in both cases further support the hypothesis that only cell surface expressed SDC1 molecules that are capable of binding polyplexes are degraded.



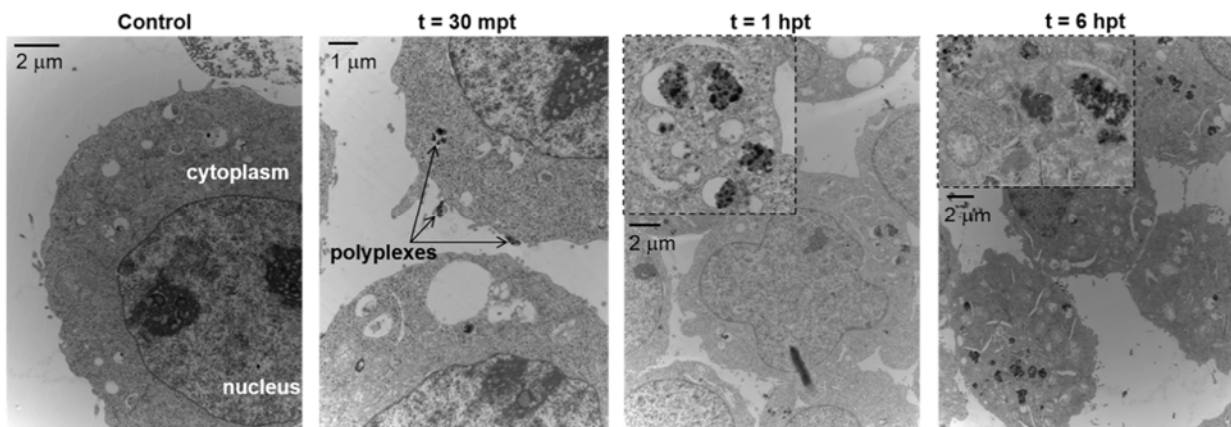
*Figure 41 : Polyplex/SDC1 complexes do not colocalize with Rab11 and SDC1 are degraded. (A) To determine whether SDC1 could be recycled to the cell membrane, SDC1/GFP-expressing cells were transiently transfected by a vector encoding for DsRed-Rab11. At 72 hpt, cells were transfected with polyplexes and plated for 45 min on MatTek 3.5-mm Petri dishes. Subsequently, cells were fixed and the localization of SDC1 (green) and Rab11(red) was assessed by confocal microscopy. Bar, 10  $\mu$ m. (B) To determine if SDC1 is degraded after endocytosis, SDC1-expressing cells were treated with 10  $\mu$ g/ml cycloheximide for 1 h prior to polyplexes addition (+) or no addition (-). At the indicated time following polyplexes addition, cells were lysed and total proteins extracts were separated by SDS-PAGE. The amount of SDC1 in transfected (+) or*



*non-transfected (-) cells was assessed by Western blotting using an antibody specific to the ectodomain of SDC1 ((N-18), Santa Cruz Biotechnology).*

### **Polyplexes are Released into the Cytoplasm and Form Large Aggregates**

The result obtained at 6 hpt showed that only few polyplexes still colocalize with the endoplasmic reticulum (ER), the TGN or the lysosomes, but are still present in the cytoplasm at 24 hpt. To determine whether polyplexes are enclosed in vacuoles or free into the cytoplasm, SDC1- expressing cells were transfected with polyplexes, fixed at 30 mpt, 1, 6 and 24 hpt and analyzed by electron microscopy. Cell examination (Fig. 42) revealed that polyplexes assemble in small particles and are mostly located at the cell surface after 30 mpt even though some polyplexes are already endocytosed. At 1 hpt, polyplex particles appear larger and mainly located in vesicles. Finally, at 6 hpt, the bulk of polyplexes form large aggregates in the cytoplasm and do not appear to be surrounded by a membrane. These aggregates are absent in non-transfected cell cytoplasm.



*Figure 42 : Polyplexes are released into the cell cytoplasm and form aggregates.*

*(A) To explore the fate of polyplexes after their release from SDC1, SDC1/GFP-expressing cells were transfected with polyplexes for the indicated period of time. Cells were then fixed and imaged by electron microscopy. Polyplexes located at the cell surface and early endocytosis could be observed at 30 mpt. At 6hpt, polyplexes are released directly into the cytoplasm, as no membrane surrounds the bulk of aggregates. Those aggregates are absent in non-transfected cells (control).*

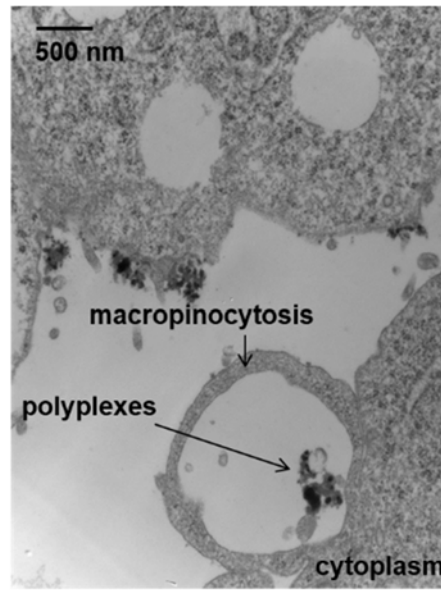
## Discussion

Despite cellular uptake, endocytosis and subsequent intracellular addressing of polyplex/receptor complexes are critical steps for gene delivery and expression, these mechanisms remain for the most part poorly characterized. This lack of information could be related, at least to some extent, to the unknown identity of the membrane proteins that can act as cellular receptor(s) for polyplexes. In this paper, using SDC1-GFP fusion protein, RITC-labeled BPEI and TOTO3-labeled DNA, we demonstrate that SDC1 can act as a membrane receptor for polyplexes and report the intracellular trafficking of polyplex/SDC1 complexes. In non-transfected SDC1-expressing cells, fluorescent microscopy analysis showed that SDC1 is homogeneously expressed throughout the cell surface. In agreement with our previous study [308], SDC1 rapidly forms numerous clusters following polyplexes addition. This observation is supported by a more recent study showing that PEI interacts with and induces clustering of SDC1 in HeLa cells [303]. Furthermore, confocal microscopy analysis shows that SDC1 and RITC-labeled BPEI are co-internalized in the same clusters, likely to be endosomal in nature. Taken together, these results demonstrate that polyplexes efficiently trigger clustering and endocytosis of SDC1, suggesting that this protein may act as a receptor for polyplexes. Based on these observations, we postulate that polyplexes would also induce clustering and endocytosis of the three other members of the syndecan family, which display a structure homology. In good agreement with this hypothesis, previous study and preliminary results obtained in our laboratory demonstrate that polyplexes efficiently induce clustering of related family members SDC2 [308], SDC3 and SDC4 (unpublished data). Interestingly, despite the fact that SDC2 forms clusters in the presence of polyplexes, its internalization is delayed compared to SDC1, resulting in an inefficient gene transfer [308]. To better understand this contrasting behavior, we tried to shed some light on the intracellular trafficking of polyplex/syndecan complexes, initially focusing on SDC1.

It was shown that polyplexes could be internalized via clathrin, caveolin and/or lipid raft dependent trafficking pathways depending on the polycation as well as the cell line used. Furthermore, internalization pathways are not necessarily independent as the existence of compensatory endocytic mechanisms have been suggested [184,365]. Using CTxB and M $\beta$ CD,



we have shown that the BPEI-based polyplexes are largely endocytosed via lipid rafts in SDC1-expressing HEK293 cells. This result is consistent with previous reports demonstrating that SDC1 undergoes raft-dependent endocytosis upon clustering [311,314]. Similarly, Tkachenko et al. [366] reported that FGF2-induced clustering of SDC4 triggers redistribution of this protein into lipid raft membrane domains in RFPEC cells. Our findings are similar to other studies done in different cell lines which show that, efficient transfection by BPEI based-polyplexes in HUH-7, COS-7, HeLa cells is mediated by the clathrin-dependent and the lipid-raft-dependent pathways [184].  $K^+$  depletion combined with incubation in hypertonic medium had no effect on attachment and / or uptake of polyplexes whereas transgene expression in 293-SDC1 cells was strongly affected. It was demonstrated that this treatment results in disappearance of clathrin-coated vesicles from the plasma membrane as well as from vesicles budding from the TGN [362]. Potassium depletion might thus also disturb polyplex-trafficking to the TGN, possibly contributing to the lower transgene expression observed following this treatment. We could also speculate that the few polyplexes internalized via the clathrin-dependent endocytosis pathway may be those that are efficiently routed to the nucleus allowing for transgene expression. Interestingly, when performing electron microscopy analysis, we clearly observed macropinocytosis of polyplexes (supplemental data presented in Fig. 43). It is noteworthy that macropinocytosis has been shown to be an efficient route for polyplex entry into cells [367]. These results illustrate that several mechanisms may be involved in polyplex endocytosis in 293-SDC1 cells. The complexity is confounded by the recent observation that inhibiting one pathway may lead to compensatory augmentation in another, causing unpredictable changes in gene delivery [365]. Furthermore, phalloidin (which specifically binds to actin) and staurosporine (which induces the disruption of the actin microfilaments) treatment of cells strongly inhibited gene expression suggesting that actin network integrity is required for the proper routing of polyplex/SDC1 endosomes (unpublished data), in agreement with previous reports [303,305].



*Figure 43 : Macropinocytosis of polyplexes.*

*Cells were fixed and imaged by electron microscopy (see materials and methods). Macropinocytosis of polyplexes can be observed at 1 hpt.*

It has been proposed that the high transfection activity of PEI resides in its ability to escape from lysosomes by provoking their osmotic swelling and rupture [117,196]. Consistent with this hypothesis, it has been shown that BPEI (25 kDa) and LPEI (800, 25 and 2.5 kDa) reach the lysosomes as they colocalize with LAMP-1 [198,209]. Interestingly, these studies also showed that almost all transfected cells accumulated polyplexes in their lysosomes, but not all lysosomes contained polyplexes [209]. Conversely, we (unpublished data) and others [197] observed the lack or weak colocalization of PEI in the lysosomal compartment using LysoTracker [198]. Expression of RFP fused to LAMP-1 in SDC1-293 cells was therefore used and we found that only a fraction of SDC1/polyplex are found in lysosomes at 2 hpt, while no colocalization could be observed at 6 hpt. Nevertheless, despite the small fraction of SDC1/polyplex endosomes fused to lysosomes, we cannot rule out the possibility that the amount of polyplexes released into the cytoplasm after lysosome membrane rupture would be sufficient to allow for gene expression. It is possible that the targeting of polyplexes to lysosomes represents one of the steps limiting the capacity of PEI to efficiently transfect cells. This observation raises the question related to the addressing of the vast majority of SDC1-containing endosomes. Indeed, using

TGN38 as a protein marker specific for the TGN [363], we showed that the largest part of endosomes containing SDC1/polyplex colocalize with this organelle at 3 hpt, suggesting that the progress of polyplexes goes along a definite pathway in HEK293 cells. The TGN is a highly dynamic organelle receiving incoming traffic from endocytic and recycling pathways [368]. Yet, no study has shown that SDC1 could be targeted to the TGN following endocytosis. Recently, Ross et al. demonstrated that H3-targeted polyplexes follow alternative mechanisms to subvert endolysosomal trafficking and harness the Golgi/ER to enhance gene transfer in CHO cells and NIH/3T3 fibroblasts [369,370]. This result suggests that other (and natural) SDC1 ligands able to induce its clustering and endocytosis would also trigger its routing to the TGN. Further investigations are required to verify this hypothesis. These observations also clearly demonstrate that the addressing of polyplexes is not restricted to lysosomes. In contrary, polyplexes are extensively targeted to the TGN, suggesting that BPEI-mediated gene delivery is more complex than initially expected.

Interestingly, polyplexes are dissociated from SDC1 once the complexes reach the TGN. Additional investigations are required to clarify the underlying mechanisms of this dissociation. As SDC1-GFP fluorescence fades away from the cytoplasm and was not found to colocalize at any time with Rab11 (a small GTPase involved in endosomes recycling), we postulated that SDC1 could be degraded. Indeed, western blot analysis revealed that SDC1 disappears rapidly after transfection of cycloheximide-treated cells compared to the non-transfected control cell, confirming our hypothesis. This raises the question on whether the SDC1-free polyplexes are still stored in vesicles or freed in the cytoplasm. Electron microscopy showed that after 6 hpt, the bulk of polyplexes lie free in the cytoplasm and form large aggregates. As polyplexes could not be degraded by the cell, and are potentially cytotoxic, we propose that the formation of these aggregates could be a mechanism used by the cells to segregate them as much as possible to protect themselves. On the other hand, as polyplexes are free into the cytoplasm and are detectable for at least 120 hpt (unpublished data); they would in theory remain available for cell transfection after reaching the nucleus. Nonetheless, the percentage of transfected cells does not increase between 48 hpt and 120 hpt, suggesting that these aggregates are stored as gene expression-incompetent aggregates.

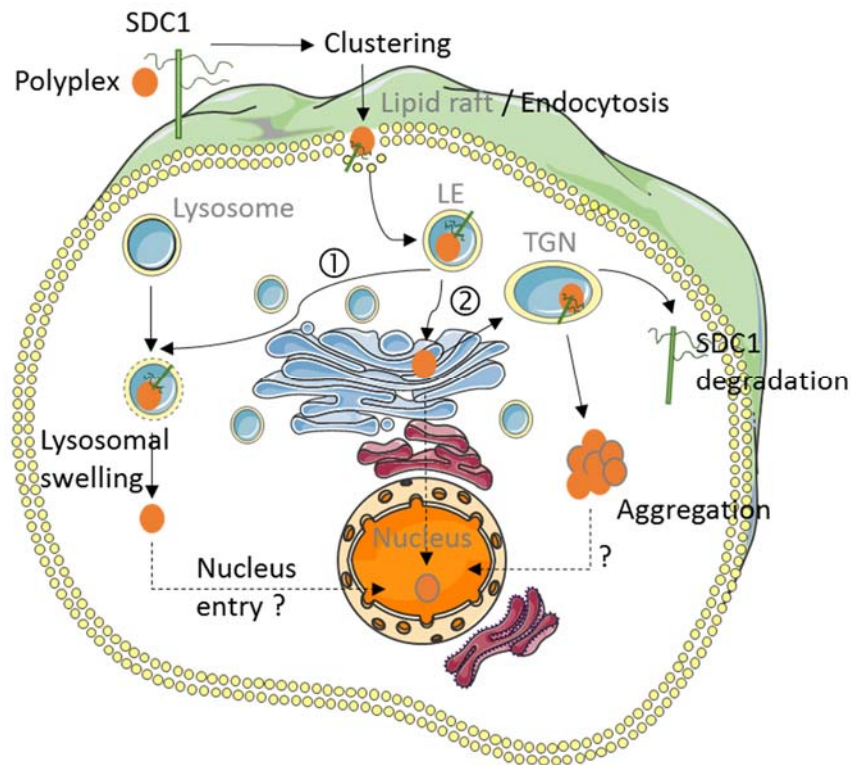


Figure 44 : Proposed model for the endocytosis and intracellular trafficking of polyplex/SDC1 complexes.

Based on our results, this diagram summarizes the progress of polyplex/SDC1 complexes in HEK293 cells. Rapidly after their addition to the cell culture, polyplex bind to SDC1 and form numerous clusters at the cell surface. Following polyplex/SDC1 complexes endocytosis via lipid raft and clathrin coated pits, among other possible pathways, some of the late endosomes (LE) endosomes are targeted to the "lysosome pathway" (1), while most of them follow the "endoplasmic reticulum (ER) pathway" (2). From the ER, complexes are addressed to the trans-Golgi network (TGN), where separation between SDC1 and polyplexes seems to occur, by a mechanism which remains to be elucidated. Finally, SDC1 is degraded, while polyplexes form large aggregates into the cytoplasm. It is possible that both ways (1 and 2) could lead to the entry of small polyplexes into the nucleus. Nevertheless, as polyplex aggregates observed in the cytoplasm appear to be very compact, we suggest that these polyplexes will not be available anymore to transfect cells.

Taken together, these results clearly demonstrate that the targeting of polyplexes to the TGN and their subsequent release into cytoplasm represents their main avenue following BPEI-

mediated cell transfection. Of note, we were not able to observe polyplex into the nucleus. We assume that polyplexes present in nucleus are of too small size to be detected by the methods used herein. On the other hand, we cannot rule out the possibility that the polyplexes does not enter into the nucleus, which implies that DNA should be released from PEI into the cytoplasm prior to entry in the nucleus, or that once in the nucleus, polyplexes dissociate very rapidly. So far, the generally admitted model for the progress of polyplexes following cell binding could be summarized in five steps: 1) endocytosis of polyplex-receptor complexes, 2) fusion of endosomes with lysosomes, 3) lysosome swelling and rupture, 4) release of polyplexes into the cytoplasm, 5) entry of polyplexes into the nucleus and transgene expression. Our study shows that this process may be more complex and probably well regulated. Based on our results, we propose a model for BPEI-mediated transfection (Fig. 44): shortly after transfection, polyplexes associate with SDC1 that form numerous clusters at the cell surface that are rapidly endocytosed via multiple pathways, but mainly via lipid raft. Most of the resulting endosomes containing polyplex/SDC1 complexes are then addressed to the TGN. Subsequently, polyplex/SDC1 complexes dissociate, SDC1 is degraded and polyplexes remain in the cytoplasm where they form large aggregates that likely do not contribute to gene expression. Our findings thus suggest a novel route by which polyplexes may reach the nucleus for an efficient gene expression. In conclusion, we identified SDC1 as a potential receptor for polyplexes and provided the first evidence that polyplex/receptor complexes rapidly accumulate in the TGN following endocytosis. These results shed some light on the role of HSPGs, and particularly for SDC1, during BPEI-mediated transfection. Taken together, these findings provide additional information of the mechanistic basis of BPEI-mediated transfection. A better understanding the intracellular fate of polyplexes will provides invaluable clues for improving of PEI-based gene transfer.

## Chapitre 4 : Importance des Glypicanes dans le Transfert de Gène

De manière générale, les cellules de mammifères sont efficacement transfectées par le polymère cationique polyéthylèneimine [117]. Ce dernier existe sous deux formes, linéaire (LPEI) ou branchée (BPEI) [118,119]. Les protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG) présents à la surface des cellules ont été proposés comme jouant un rôle clé dans la capture des polyplexes à base de PEI par les cellules [300]. Ce type de démonstration repose sur des traitements enzymatiques ou chimiques visant spécifiquement ces glycoprotéines, ou encore faisant intervenir des mutants déficients en HSPG [178,304]. L'importance des HSPG dans le contexte du transfert de gène est aujourd'hui admise [353] bien que controversée dans quelques études [309,310,315,316]. Leur rôle vis-à-vis du transfert de gène est étudié dans sa globalité alors que les HSPG constituent un ensemble de deux familles : les syndécanes (SDC) et les glypicanes (GPC) dont la structure de leur protéine centrale diffère drastiquement. Dans le contexte présent, le rôle des glypicanes est particulièrement négligé probablement en raison de l'absence de domaine cytoplasmique. Ils sont de ce fait considérés comme des molécules auxiliaires permettant probablement le recrutement d'autres molécules impliquées dans l'endocytose des polyplexes.

Cette étude a pour objectif de mieux comprendre l'implication des glypicanes dans le mécanisme du transfert de gène par le PEI. Après avoir optimisé les conditions de transfection des cellules CHO et HEK293 par le LPEI et BPEI, nous avons entrepris une série de traitements (figure 45) visant dans un premier temps à limiter la sulfation des HSPG grâce au traitement chimique des cellules par le chlorate de sodium, un analogue du sulfate. Nous avons ensuite procédé au traitement enzymatique des cellules par l'héparinase III qui clive spécifiquement les chaînes d'héparanes sulfates. Finalement, les glypicanes présents naturellement à la surface des cellules CHO et HEK293 ont été éliminés par l'action de l'enzyme phosphatidylinositol phospholipase C (PIPLC). Cette étude est principalement basée sur une approche « perte de fonction » nous permettant de confirmer l'importance de la sulfation comme modification post-traductionnelle et de préciser le rôle des glypicanes dans le mécanisme du transfert de gène des cellules CHO et HEK293 en vue de son optimisation.

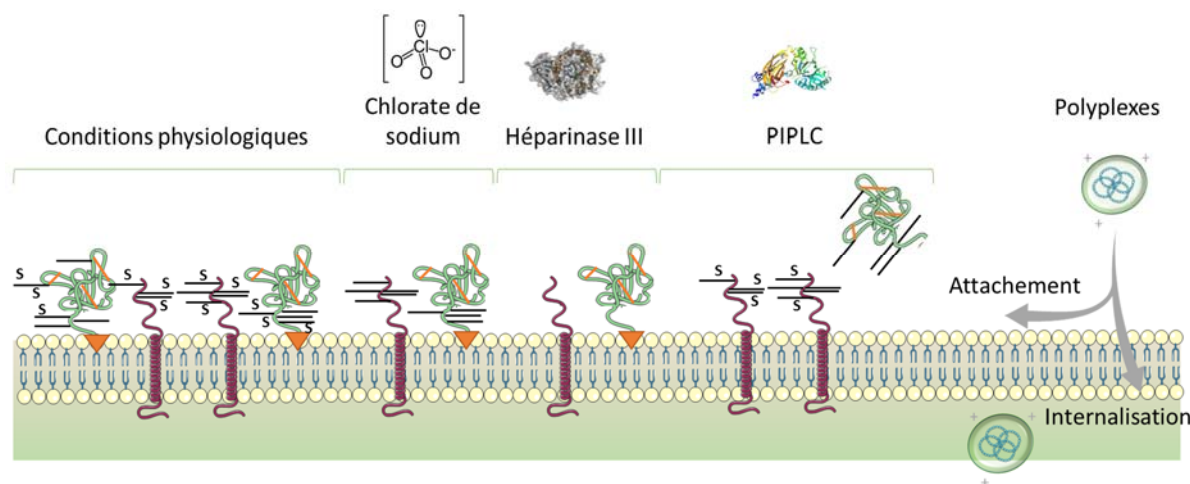


Figure 45 : Résumé graphique de l'étude concernant l'implication des glypicanes dans le transfert de gène.

## Role of Sulfated Glycosaminoglycans and Glypicans in Polyethylenimine-Mediated Gene Transfer of CHO and HEK293 Cells

### Abstract

Polyethylenimine (PEI) is a widely used cationic carrier that condenses DNA allowing cellular uptake and efficient intracellular route of the complexes. Furthermore, PEI is the preferred carrier in large-scale transient gene expression mainly because of its efficiency and cost-effectiveness. It exists in two forms, branched (BPEI) or linear (LPEI). Due to electrostatic interactions, positively charged DNA complexes interact with anionic heparan sulfate proteoglycans located at the cell surface. This interaction could influence DNA complexes endocytosis and thus transgene expression. Glypican is one of the two major families of heparan sulfate proteoglycans. Their role in gene delivery is nevertheless largely unexplored. To further clarify the importance of heparan sulfate proteoglycans and glypicans in PEI gene transfer of CHO and HEK293 cells, we used a series of treatments (sodium chlorate, heparinase III or

phosphatidylinositol-specific phospholipase C) that were correlated with uptake of BPEI and LPEI based complexes, and subsequent expression of reporter genes. The latter were dependant on cell type and structure of the carrier. Interestingly, glypicans inhibit the transgene expression following LPEI-mediated transfection. This observation might offer new strategies to improve transient gene expression in CHO and HEK293 cells.

## Introduction

The transfer of exogenous genetic material into host cells was established for the first time in 1972 by Cohen *et al.* [11]. Five years later, somatostatin was the first human recombinant protein (r-protein) and was produced in *Escherichia coli* [13]. Challenges associated with the production of more complex and glycosylated r-proteins brought the scientific community to develop mammalian expression systems. Thus, the expressed human r-proteins are correctly folded and biologically actives. The transfer of genetic materials into mammalian cells for the expression of functional r-proteins is a biological process which usually involves the use of plasmid DNA (pDNA) complexed with natural or synthetic carrier molecules such as cationic lipids or polymers [129,371]. Among the latter, the synthetic polymer polyethylenimine (PEI) is probably the most popular due to its efficacy, ease of use, cost-effectiveness and stability in solution [117,372]. Consequently, PEI is largely employed for the rapid production of r-proteins at large scale. Such process allows for the generation of milligram to gram quantities of r-proteins in a short period of time to support pre-clinical, biochemical and biophysical studies [318,322,357,372,373]. Besides that, PEI is also extensively studied in the context of non-viral gene therapy as it is a safer alternative to viral carriers [341,344,345]. The structure of PEI can be branched (BPEI) or linear (LPEI) depending on their synthesis route [119]. Both are capable to efficiently condense pDNA to form small nanoparticles termed polyplexes [58]. The latter must circumvent a number of cellular barriers to deliver the gene of interest to the cell nucleus [371,374]. *In vitro*, the cell membrane is the first obstacle in gene delivery.

The first evidence of a role for heparan sulfate proteoglycan (HSPG) in cation-mediated gene transfer was presented in 1996 by Mislick and Baldeschwieler [300]. Since then, it is well acknowledged that polyplexes are taken up by the cell via interactions with HSPGs expressed at the cell surface [353]. Indeed, polyplexes exhibit a net positive charge when formed at the



optimal conditions, thus interact electrostatically with anionic HSPGs and can enter into cells via endocytosis [301–305,308]. Interestingly, it was showed that this interaction is not solely governed by electrostatic interactions. Indeed, the affinity between sulfated GAGs and polyplexes is possibly dependant on the nature of the polymer, suggesting that other interactions may occur [316]. If the absence of sulfate inhibits gene transfer efficiency [300], a high density of HS promotes polyplex uptake in mammalian cells [304,307]. However, the binding of polyplexes are not always correlated to their internalization [302,308] nor to their intracellular path [310]. This suggests that uptake and transgene expression are function of the relative abundance of different GAG-carrying proteins rather than the overall HSPG level [353].

HSPGs comprise an assorted group of proteins that contain covalently linked heparan sulfate (HS) glycosaminoglycan (GAG) chains. There are two major families of HSPGs that are largely expressed at the surface of mammalian cells, namely the syndecans composed of four members (SDC1-4) and the glypicans that consist of six members (GPC1-6). Whereas the core protein of SDCs is type I integral membrane protein exhibiting a short cytoplasmic tail, the core protein of GPCs possesses a glycosyl phosphatidylinositol (GPI) anchored extracellular domain attached at their carboxyl terminus [375]. In the context of gene delivery, the role of HSPGs at the cell surface is mainly studied as a whole. The striking difference in structure between SDCs and GPCs may suggest that they are not involved to the same extent in the binding and internalization of polyplexes. While some studies have demonstrated that SDCs can be understood as receptors for polyplexes capable of driving their endocytosis [303,305,308], the role of GPCs in gene transfer process has not been investigated yet.

The present study was undertaken to examine the role of GPCs in PEI-mediated gene transfer in CHO and HEK293 mammalian cells. With the aim to investigate the need for sulfated GAGs in gene delivery, we first studied the effect of lowering sulfation levels with sodium chlorate treatments on polyplex uptake and transgene expression in CHO and HEK293 cells. As HS are the most sulfated and thus most anionic GAGs present at the surface of mammalian cells, we evaluated in like manner the effect of heparinase III enzymatic treatments which results in the selective cleavage of heparan sulfate. To further determine if cellular entry of polyplexes is mediated by cell surface HSPGs, we studied the presence of HS using a specific anti-HS

antibody before and after LPEI and BPEI transfection. We then investigated the role of GPCs in PEI-mediated gene transfer thanks to phosphatidylinositol phospholipase C (PIPLC) treatments, which releases GPI-anchored proteins. To the best of our knowledge, this is the first study attempting to evaluate the role of glypicans in polyplex-mediated gene transfer. Further investigations are necessary and may represent a novel strategy to improve efficiency of gene delivery in CHO and HEK293 cells.

## Materials and Methods

### Materials

The 25 kDa linear (LPEI) polyethylenimine was obtained as a powder from Polysciences (Warrington, Pennsylvania, USA). The cyanine dye YOYO-1® iodide (1 mM solution in DMSO), Pluronic® F-68, trypan blue solution 0.4% (w/v), serum-free Freestyle™17 (F17) expression medium and FITC-conjugated goat anti-mouse IgM were purchased from Life Technologies Inc. (Burlington, Ontario, CA). The 25 kDa branched polyethylenimine (BPEI), sodium chlorate, the *Bacillus cereus* PIPLC, heparinase III (heparitinase, from *Flavobacterium heparinum*, EC 4.2.2.8), L-glutamine and the FITC conjugated mouse anti-VSV-G antibody (clone P5D4) were obtained from Sigma-Aldrich® (Oakville, Ontario, CA). TN1 peptone was obtained from Teknisciences (Terrebonne, Quebec, CA). Mouse anti-heparan sulfate antibody (clone 10E4) was from Seikagaku Kogyo Co. (Tokyo, Japan). The phage display-derived, sulfation-specific, single-chain anti-HS antibodies AO4B08, EV3C3, HS4C3, and RB4EA12 were kindly provided by Dr. Van Kuppevelt (Radboud University Nijmegen Medical Center).

### Cell Maintenance

The 293-6E and CHO-3E7 cell lines stably expressing truncated Epstein-Barr virus Nuclear Antigen-1 (EBNA1) were maintained as a suspension culture in F17 medium supplemented with 4 mM L-glutamine and 0.1% Pluronic-F68 (and 25 µg/mL geneticin G418 for 293-6E cells). CHO-3E7 cells were routinely diluted every two to three days at  $0.3 \times 10^6$  cells/mL ( $0.07 \times 10^6$  cells/mL for weekends) in 50 mL total volume in a 250 mL plastic Erlenmeyer flask (Corning®). 293-6E cells were also diluted every two to three days at  $0.5 \times 10^6$  cells/mL ( $0.25 \times 10^6$  cells/mL

for weekends). Cell cultures were operated on an orbital shaking platform at an agitation rate of 120 rpm at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Cell density and cell viability were determined by direct counting of cell samples with a Cedex automated cell counting system (Innovatis) using the trypan blue exclusion method.

## **Cell Treatments**

### *Chemical Treatment*

F17 medium was supplemented with sodium chlorate, which is an inorganic compound that down-regulates the sulfation reactions [376]. A stock solution of 800 mM of sodium chlorate was prepared and added to F17 culture medium at various final concentrations to determine the optimal concentration to efficiently reduce sulfation. A volume of 15 mL of CHO-3E7 cells were grown for 48 hours in presence of four sodium chlorate concentrations (0 mM, 20 mM, 35 mM and 50 mM). On the other hand, 293-6E cells were treated likewise with increasing concentrations of sodium chlorate ranging from 0 mM to 100 mM (0 mM, 20 mM, 50 mM and 100 mM). Prior to transfection, cell density and viability were determined to evaluate the effect of sodium chlorate treatments on these parameters which could affect gene transfer efficiency. When necessary, cell density was adjusted to  $1,5 \times 10^6$  cells / mL with the addition of fresh sodium chlorate-supplemented F17 medium. Indeed, to reduce sulfation, the presence of sodium chlorate was maintained prior to and after transfections.

### *Enzymatic Treatments*

Heparinase III selectively cleaves heparan sulfate proteoglycans and was used to remove HS chains from CHO-3E7 and 293-6E cell surface.  $1,5 \times 10^6$  cells / mL were incubated for six hours with 5 mU / mL of bacterial heparinase III at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. After 3 hours of incubation, an extra 5 mU / mL of the enzyme were added to cell cultures and incubated in the same conditions for an additional 3 hours. Cells were washed once and re-suspended in fresh F17 medium prior to PEI-mediated transfection.

For phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PIPLC) treatments, CHO and HEK293 cells were treated with 7 mU (per mL of culture) of PIPLC for two hours at 37°C in a humidified 5%

CO<sub>2</sub> atmosphere. Following PIPLC treatments, cells were washed once and re-suspended in fresh F17 medium prior to transfection.

In parallel to each treatment, control cells were left untreated and processed in like manner.

### Cell Surface Immunofluorescence

Immunostaining with antibody 10E4 (Seikagaku), which recognizes heparan sulfate domains characterized by N-sulfation, were performed as follows. A sample of  $1 \times 10^6$  cells / mL were washed in cold PBS containing 1 % BSA and incubated with anti-HS antibody 10E4 at 1:150 for 1 hour at 4°C. Following primary incubation, cells were washed twice in cold PBS/1% BSA and stained with anti-mouse IgM FITC conjugated antibody (Sigma) at 1:500 for 30 minutes at 4°C. After two washes in cold PBS/1% BSA, cells were immediately analyzed by flow cytometry. Phage display RB4EA12, HS4C3, EV3C3, AO4BO8 antibodies containing a vesicular stomatitis virus glycoprotein (VSV-G tag) were used according to the same procedure. Primary incubation was performed at 1:5 following a secondary incubation with anti-VSV-G FITC conjugated antibody at 1:500. A list of antibodies used in this study are shown in Table 4.

*Tableau 4 : List of antibodies used in this study.*

Antibody	Preferred chemical group	HS domain	References
RB4EA12	O-sulfated residues containing IdoA-GlcNS6S	NS and NS/NA domains	[377]
HS4C3	O-sulfated residues containing IdoA2S-GlcNS3S6S	NS domain	[378]
EV3C3	Preferentially 3-O sulfated residues	NS/NA domain	[378]
AO4BO8	O-sulfated residues containing IdoA2S-GlcNS6S	NS domain	[378]
10E4	N-sulfated residues	NS and NS/NA domains	[379,380]

## Transfection

Cell density should be around  $1,5$  to  $2,0 \times 10^6$  cells / mL and viability greater than 98% to ensure optimal transfection. If the cell density was greater than  $2,0 \times 10^6$  cells / mL, the cells were diluted to desired density with fresh growth medium. The cell suspension was distributed in 6-well plates (1.8 ml/well). Prior to transfection, plasmid DNA encoding for the blue fluorescent protein was labeled with YOYO-1® iodide dyes. Two  $\mu$ l of YOYO-1 were mixed with 50  $\mu$ g of plasmid DNA. The preparation was incubated at room temperature for 2 hours in the dark. PEI/DNA polyplexes were prepared in 5% of the initial culture volume with a total of 1  $\mu$ g DNA per ml of culture to be transfected. An equal volume of diluted PEI was added to the DNA solution. The optimal ratios to transfect CHO-3E7 and 293-6E cells with LPEI and BPEI based polyplexes were previously determined (Supplemental figure 53) and are summarized in Table 5. The mixture was first vortexed gently for 5 seconds and then incubated for 10 min at room temperature before being added drop-wise to cell culture.

*Tableau 5 : List of pDNA:PEI ratios used to transfect HEK293 and CHO cells and physicochemical characteristics of the corresponding polyplexes.*

	CHO-3E7			293-6E		
	pDNA:PEI (w:w)	Zeta potential (mV)	Polyplex size (nm)	pDNA:PEI (w:w)	Zeta potential (mV)	Polyplex size (nm)
LPEI	1:8	$32,3 \pm 0,5$	$86,1 \pm 2,9$	1:3	$27,8 \pm 0,6$	$86,7 \pm 2,9$
BPEI	1:5,5	$34,1 \pm 1,9$	$66,5 \pm 2,1$	1:2,5	$33,3 \pm 2,1$	$64,5 \pm 4,1$

## **Polyplex Uptake Analysis**

Determination of polyplex cellular uptake was performed 24 hours post-transfection (hpt) as we showed that at this time point internalization of polyplexes into cells is complete and reaches a plateau (Supplemental figure 54). 200 µl of transfected cell culture sample was removed from the 6-well plates and filtered through a Nitex tissue 310 µm mesh (Sefar Group). Emission spectra of DNA-bound YOYO-1 were recorded on a BDLSRII cytometer (BD Biosciences, Mississauga, ON) in presence of trypan blue (0.2% final concentration) which quenches cell surface binding allowing the measurement of pDNA complexes internalization in CHO and HEK293 cells. Only viable and single cells were analyzed.

## **Transgene Expression**

Expression of BFP reporter protein was analyzed by flow cytometry after 48 hours post transfection. Only viable and single cells were analyzed.

Determination of secreted embryonic alkaline phosphatase (SEAP) was performed essentially as previously describes [325]. Briefly, SEAP was assessed at day 6 post- transfection (dpt). SEAP transfected cells were centrifuged and the supernatant was diluted in water (typically 1/1000). Fifty microliter of diluted supernatant was transferred to a 96-well plate and mixed with an equal volume of SEAP assay solution containing 20mM paranitrophenyl phosphate (pNPP), 1mM MgCl<sub>2</sub>, and 1M diethanolamine. Absorbance was read at 405 nm at 1 min intervals for 5 min.

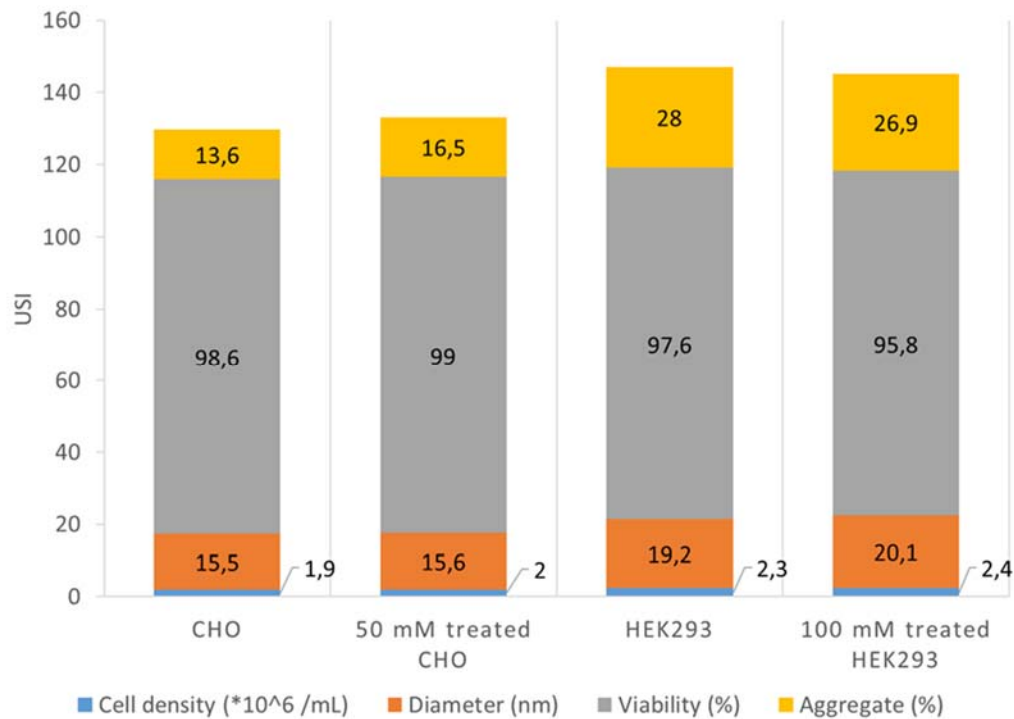
## **Results**

### **Sodium Chlorate Treatment Reduces HS Sulfation**

Sodium chlorate treatment of cells has been widely used to study the role of sulfated GAGs in gene delivery [300,303,310,381–383]. To monitor the effect of sodium chlorate on HS sulfation, samples from control and chlorate-treated cells were stained with anti-HS antibodies. The monoclonal anti-HS epitope 10E4 (mAb 10E4) is commercially available and has been widely used as a research reagent [380]. It has been shown that mAb 10E4 reacts with an epitope that

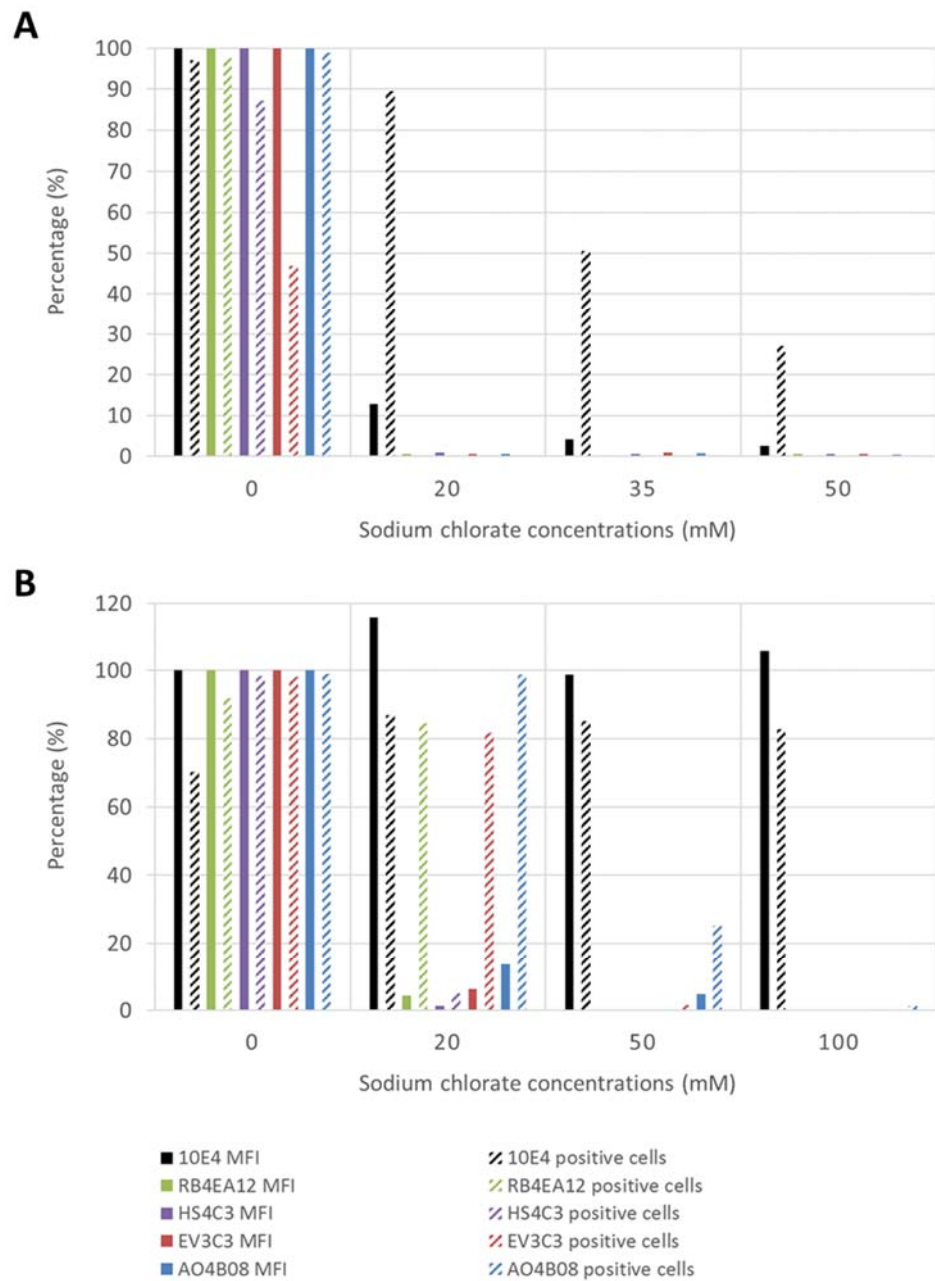
occurs only in heparan sulfate chain and that N-sulfate residues form part of the epitope [379]. In addition, a series of non-commercially available anti-HS antibodies were used to assess the presence of O-sulfated residues in HS, namely RB4EA12, HS4C3, EV3C3, AO4BO8 antibodies and some of their characteristics are shown in Table 4.

Although chlorate treatment decreases the overall HS sulfation, the N- and O-sulfation were differentially affected. In CHO cells, chlorate treatment (20, 35 and 50 mM) led to a decrease in N-sulfation in a dose-dependent manner and to a dramatic loss of O-sulfation at the lowest sodium chlorate concentration (figure 46A). Interestingly, at the concentrations tested in HEK293 cells (20, 50 and 100 mM), sodium chlorate treatment reduced the O-sulfation without decreasing the N-sulfation (figure 46B). Surprisingly, the N-sulfation seems to be up-regulated in chlorate-supplemented medium (20 and 100 mM) indicating that the N-deacylation / N-sulfation of residues (by NDST enzyme) was highly resistant to chlorate treatment as it was shown elsewhere in MDCK cells [376]. These data suggest that sodium chlorate reduces N- and O-sulfations in a dose-dependent manner in CHO cells while in HEK293 cells, only O-sulfation was inhibited whereas N-sulfation resists even at 100 mM sodium chlorate. Moreover, cellular morphology and proliferation remained normal at all chlorate concentrations (figure 47, showing the effect of the highest sodium chlorate concentrations on CHO and HEK293 cells).



*Figure 47 : Effect of sodium chlorate on cell growth, viability and morphology. CHO and HEK293 cells were grown in presence of the highest sodium chlorate concentration (50 and 100 mM respectively). After 48 hours, total cell density, viability, diameter and percentage of aggregation were determined with an automated cell counting system. The data are representative of four independent experiments.*





*Figure 46 : Effect of sodium chlorate treatment on HS sulfation.*

*CHO (A) and HEK293 cells (B) were treated with increasing concentrations of sodium chlorate and analyzed by flow cytometry for cell surface HS levels. The data are representative of four independent experiments.*

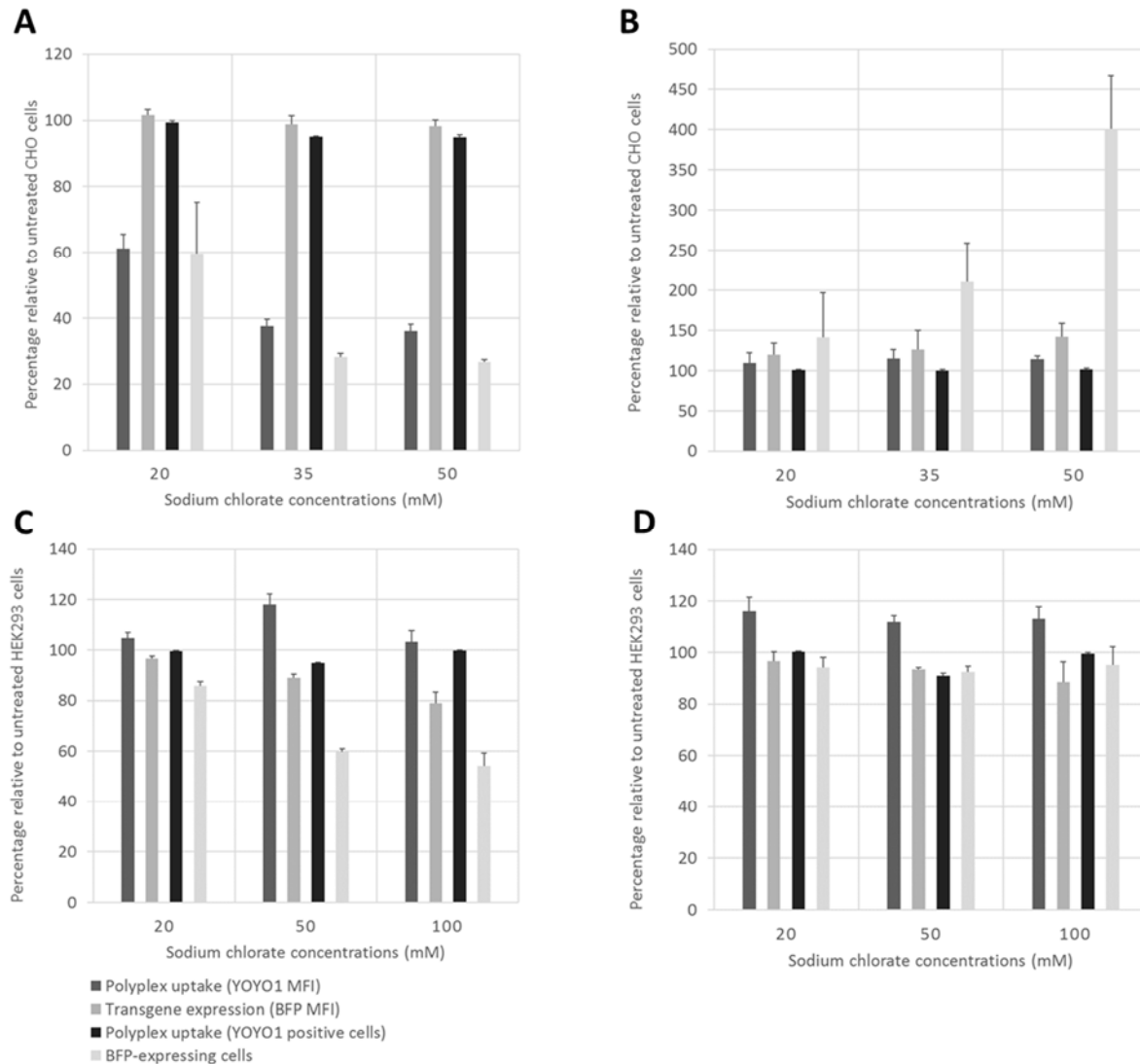
## **Role of Sulfation in Polyethylenimine-Mediated Gene Delivery in CHO and HEK293 Cells**

Based on the negative charges provided by the sulfate groups of heparan sulfate chains and the positive charges of polyethylenimine-based polyplexes, interactions between the two can occur in an electrostatic manner [300]. Indeed, it was demonstrated in numerous studies (for review see [223,351,382,383]) that HSPG located on cell surface serve as binding sites for polyplexes, thus, facilitating polyplex uptake by the cells. However, a given cell type likely exhibit a specific panel of HSPGs as well as a unique glycans structural polymorphism due to distinct post-translational modifications. Therefore, we can assume that HSPGs may contribute in a different way in gene transfer process depending on cell and polymer type. To test the role of sulfated GAGs in polyethylenimine-mediated transfection in CHO and HEK293 cells, the cells were grown in the presence of increasing concentrations of sodium chlorate for 48 hours and transfected with LPEI and BPEI.

In CHO cells, the LPEI-mediated transfection efficiencies were reduced in a chlorate dose dependent manner as shown by the decrease of BFP-expressing cells (figure 48A). At the lowest concentration of sodium chlorate (20 mM), the transfection efficiency was 60% relative to untreated cells while at 50 mM, transfection efficiency was 30% relative to untreated cells. This was correlated with the down-regulation of polyplex internalization. Interestingly, the remaining BFP-expressing cell population exhibit similar BFP expression level compared to untreated cells (figure 48A). Unexpectedly, in CHO cells transfected with BPEI, transfection efficiency and BFP transgene expression were both enhanced in chlorate-treated cells while polyplex internalization was not affected. Indeed, transfection efficiency and BFP expression were 400% and 150%, respectively, relative to untreated cells, while polyplex internalization was not impaired (figure 48B).

In chlorate-treated HEK293 cells, the reduced HS O-sulfation content correlated with lower LPEI transfection efficiency and transgene expression, as they were respectively 55% and 75% (100 mM) relative to untreated cells (figure 48C). On the other hand, BPEI-mediated transfection was slightly affected as transgene expression and percentage of BFP-expressing cells were reduced by only 10% in HEK293 cells treated with 100 mM sodium chlorate. In both

scenario (LPEI and BPEI-mediated transfection), polyplex internalization was not significantly altered in chlorate-treated HEK293 cells (figure 48D).



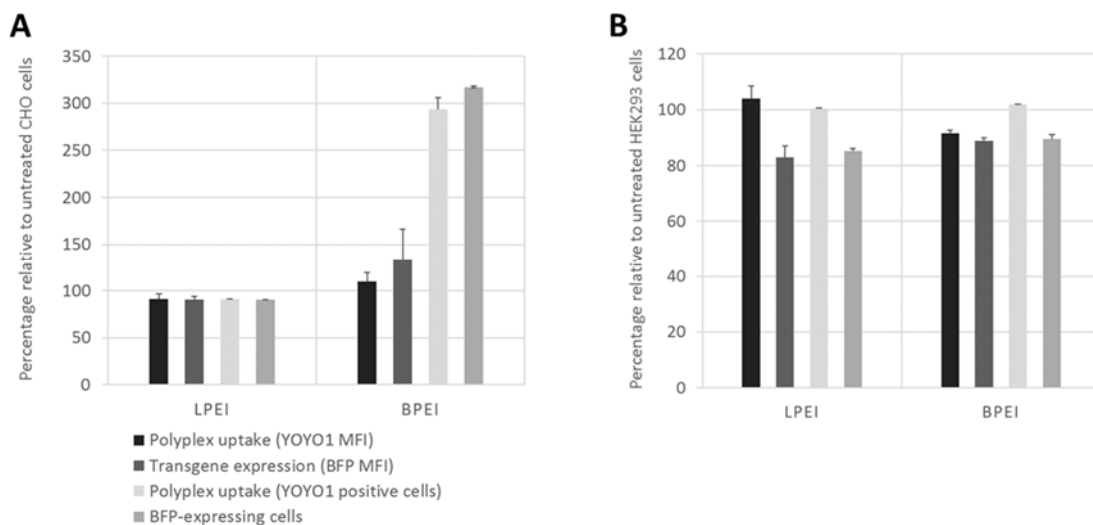
*Figure 48 : Effect of undersulfation on polyplex uptake and transgene expression. Chlorate-treated cells were transfected with LPEI and BPEI using YOYO1-labeled pDNA encoding for the blue fluorescent protein. CHO (A: LPEI, B: BPEI) and HEK293 (C: LPEI, D: BPEI) cells were analyzed by flow cytometry to determine polyplex uptake and transfection*

*efficiency compared to untreated cells. Mean values  $\pm$  SD were obtained from triplicate samples and the data are representative of four independent experiments.*

### **Are Heparan Sulfate Proteoglycans the Main Contributor for Polyethylenimine-based Polyplex Uptake in CHO and HEK293 cells?**

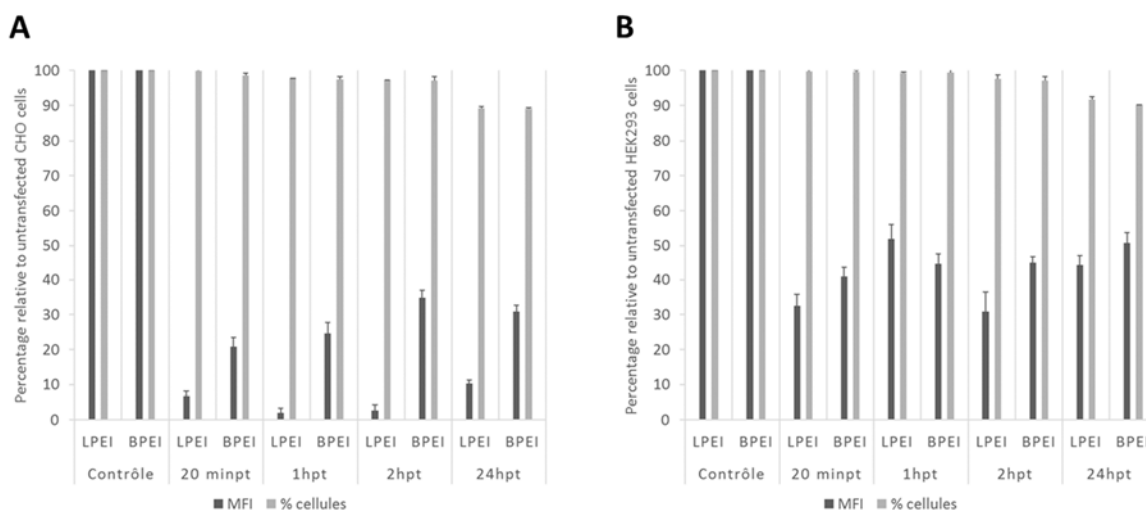
Membrane sulfated GAGs comprise different members including chondroitin sulfate (CS), dermatan sulfate (DS), keratan sulfate (KS) and heparan sulfate (HS) [386]. Although the reduced GAGs sulfate content in CHO and HEK293 cells modulate polyplex uptake and PEI transfection efficiencies, we wanted to determine whether HS were mainly responsible for these events. Thus, CHO and HEK293 cells were treated with heparinase III to specifically remove HS [387].

Overall, polyplex uptake and transgene expression in CHO and HEK293 cells were modified in the same way as previously observed following sodium chlorate treatment (figure 48), but not to the same extent. LPEI-mediated transfection of CHO cells treated with heparinase III was only slightly decreased by 10% (polyplex uptake and transgene expression) whereas BPEI-mediated transfection of heparinase III-treated CHO cells was up-regulated (133% of BFP expression and 317% of BFP-expressing cells relative to untreated cells) (figure 49A). In HEK293 cells treated with heparinase III, the transfection efficiency (BFP transgene expression and BFP-expressing cells) was reduced by less than 20% while polyplex uptake was not affected. Finally, the BPEI-mediated transfection efficiency was a little reduced (figure 49B).



*Figure 49 : Polyplex uptake and transgene expression following heparinase III treatment. CHO (A) and HEK293 (B) cells were treated with heparinase III and transfected with LPEI and BPEI using YOYO1-labeled pDNA encoding for the blue fluorescent protein. Treated cells were analyzed by flow cytometry to determine polyplex uptake and transfection efficiency compared to untreated cells. Mean values  $\pm$  SD were obtained from triplicate samples and the data are representative of four independent experiments.*

As these results were unexpected and might suggest that HS are not the main contributor for polyethylenimine-based polyplex uptake, we followed the presence of HS on CHO and HEK293 surface cell after PEI transfection (Figure 50). We observed a substantial reduction in HS at the CHO cell surface after LPEI-mediated transfection suggesting that LPEI-based polyplex uptake do required HS. Indeed, HS content was less than 10% relative to untransfected cells. Interestingly, the reduction of cell surface HS after BPEI transfection of CHO cells was half of that observed following LPEI transfection (20,9 to 34,8% relative to untransfected cells). Similarly, we saw a reduction of the cell surface HS content after LPEI and BPEI-mediated transfection of HEK293 cells although it was less pronounced than that in CHO cells (32,5 to 51,9% relative to untransfected HEK293 cells). It has to be noted that HS signal was not fully recovered at the surface of CHO and HEK293 cells even 24 hours after transfection indicating that the removal of HS was not due to their normal turnover.



*Figure 50 : Heparan sulfate in LPEI- and BPEI-mediated transfection of CHO and HEK293 cells.*

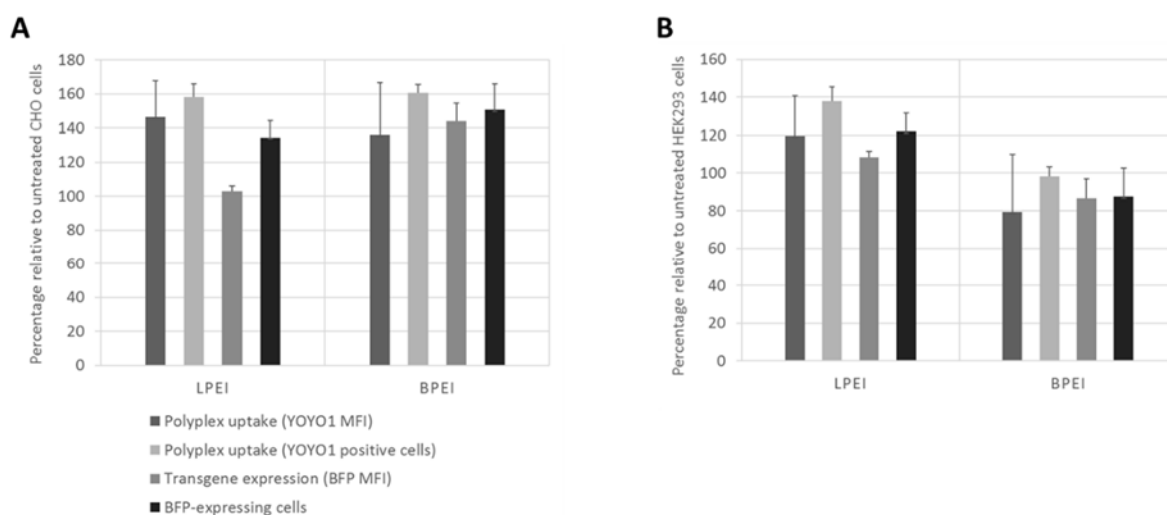
*CHO (A) and HEK293 cells (B) were transfected with LPEI and BPEI and analyzed by flow cytometry for cell surface HS levels until 24 hpt. Mean values  $\pm$  SD were obtained from duplicate samples.*

### **Role of Glypicans in Polyethylenimine-mediated Gene Delivery in CHO and HEK293 Cells**

Among heparan sulfate proteoglycans, the role of syndecans have been extensively studied in the context of gene delivery [305,308,388,389] probably due to the functional significance of their cytoplasmic tail. However, the other major family of HSPGs is glypicans which are composed of six members (GPC1-6) tethered to the cell membrane via a glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) anchor. Because of the GPI linkage to the cell membrane, GPCs do not possess an intracellular cytoplasmic tail like the SDCs. Furthermore, GPCs carry only heparan sulfate chains while some SDCs (SDC1 and SDC3) have CS chains attached to their core protein. To investigate the role of GPCs in gene delivery, polyplex uptake and transfection efficiency was tested in PIPLC-treated CHO and HEK293 cells. The phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PIPLC) enzyme cleaves GPI-anchored proteins and efficiently

releases cell surface GPI-anchored mRFP1 used here as a control of treatment effectiveness (Supplemental figure 55).

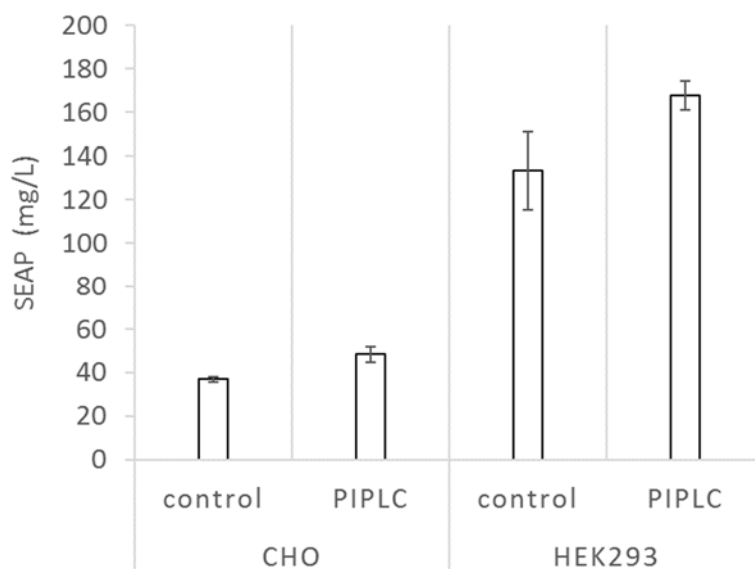
In PIPLC-treated CHO cells (Figure 51A), we observed that LPEI-based polyplex uptake was upregulated by 160% relative to untreated cells leading to an increase in transfection efficiency (130% relative to untreated cells). On the other hand, despite BPEI polyplex uptake was enhanced in PIPLC-treated CHO cells (160% relative to control), no significant impact could be seen on transfection efficiency or transgene expression (figure 51A). In PIPLC-treated HEK293 cells (figure 51B), we found that LPEI transfection was enhanced as seen by the increase of BFP-expressing cells and transgene expression (120% and 110% relative to untreated cells respectively). This was correlated with an up-regulation of LPEI polyplex uptake. Conversely, the removal of GPCs decreased BPEI polyplex uptake (80% relative to untreated cells), transfection efficiency and transgene expression (both 85% relative to untreated cells).



*Figure 51 : Polyplex uptake and transgene expression after glypicans removal.*

*CHO (A) and HEK293 (B) cells were treated with PIPLC and transfected with LPEI and BPEI using YOYO1-labeled pDNA encoding for the blue fluorescent protein. Treated cells were analyzed by flow cytometry to determine polyplex uptake and transfection efficiency compared to untreated cells. Mean values  $\pm$  SD were obtained from triplicate samples and the data are representative of three independent experiments.*

Our results indicated that the presence of GPCs inhibits in part LPEI-based polyplex uptake and LPEI transfection efficiency in CHO and HEK293 cells. In order to further validate our findings, we compared the expression of SEAP reporter protein in PIPLC-treated and untreated cells. Although the removal of CHO and HEK293 cell surface GPCs increased the protein yield, it was not statistically significant.



*Figure 52 : SEAP protein yield in PIPLC-treated CHO and HEK293 cells.*

*CHO and HEK293 cells were treated with PIPLC and transfected with LPEI to produce the secreted SEAP protein. Mean values  $\pm$  SD were obtained from triplicate samples and the data are representative of two independent experiments.*



## Discussion

We have used sodium chlorate treatment in order to investigate the role of sulfation in LPEI- and BPEI-mediated gene transfer in CHO and HEK293 cells. Chlorate competitively inhibits the formation of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) which is the high energy sulfate donor in cellular sulfation reactions [376]. We found that the different sulfation reactions (O-sulfation *versus* N-sulfation) differed noticeably in susceptibility to sodium chlorate treatment. In CHO cells, O-sulfation was reduced to a great extent at the lowest sodium chlorate concentration while N-sulfation was reduced in a dose dependent manner. In HEK293 cells, the data showed that O-sulfation is impaired at a relatively low sodium chlorate concentration (20 mM) whereas N-sulfation resists to even 100 mM sodium chlorate. In agreement with our results, it was previously shown that sodium chlorate treatment affects different sulfation reactions to different extents in MDCK cells [376] and the authors attributed this effect to the different PAPS affinities of the sulfotransferase species involved [390–392]. Indeed, biosynthetic sulfotransferases are present in several isoforms [393] that possibly have different PAPS affinities. Our results showed that reduced level of sulfation achieved by the sodium chlorate treatment depends on its concentration, and that N- and O-sulfations were not affected to the same extent in a given cell type. Furthermore, the susceptibility to sodium chlorate treatment was also dependant on cell type and not due to other external factors since CHO and HEK293 cells were grown in the same culture medium (i.e. identical sulfate supplementation). This suggests that CHO and HEK293 cells might exhibit different sets of sulfotransferases which probably contribute to distinct HS polymorphism.

Transfection of chlorate-treated CHO cells with LPEI indicated that polyplex uptake was reduced in a dose dependant manner, thus drastically decreasing the efficiency of gene transfer. These observations are in good agreement with numerous studies that demonstrated the importance of sulfated GAGs in gene delivery [300,304,305,307–309,316,381,383,394]. However, Ruponen *et al.* [310] revealed that sulfated GAGs inhibit cation-mediated gene transfer in SMC and CHO cells but did not mention whether PEI used for the study was branched or linear. Very interestingly, Hanzlíková *et al.* [151] showed that cell-surface GAGs have a negative impact on BPEI-mediated transfection in CHO cells and that free PEI can overcome

the undesirable binding of polyplexes to GAGs. In accordance with these previous results, we observed that the removal of GAG sulfation resulted in enhanced polyplex uptake and BPEI-mediated transfection in CHO cells. Polyplexes formed with BPEI and LPEI exhibit similar zeta potential suggesting that interaction between polyplexes and sulfated GAGs leading to efficient gene transfer is more dependent on polymer type rather than exclusively ruled by electrostatic interactions. In chlorate-treated HEK293 cells, LPEI- and BPEI-mediated transfection were less efficient compared to untreated cells while polyplex uptake was not affected. Due to the limited effect of sodium chlorate treatment on HEK293 N-sulfation under the experimental conditions used here, the altered transfection efficiency seen in chlorate-treated cells may only be imparted to the elimination of O-sulfation. Thus, the persistence of N-sulfation after sodium chlorate treatment in HEK293 cells might explain why polyplex uptake was not affected.

Because HS are the most anionic GAGs expressed in mammalian cells (except for heparin expressed in mast cells), they are considered as the main target for polyplex attachment. With the aim to investigate specifically the role of HS in polyethylenimine gene delivery in CHO and HEK293 cells, the latter were treated with heparinase III to remove HS from the cell surface. Although heparinase III treatment leads to a severe decrease in fluorescence signal of FITC conjugated anti-HS antibody (our observation and [304]), the complete removal of the entire HS chains should not be confirmed using this method. Indeed, the enzyme cleaves selectively HS chains containing  $\alpha$ 1-4 linkages between N-acetyl-hexosamines and glucuronic acid residues leaving behind a neo-epitope that can be detected with the anti-HS 3G10 antibody (Supplemental figure 56), suggesting the presence of residual HS chains. Thus, the removal of the entire HS chain cannot be assessed with certainty [310]. Transfections done following heparinase III treatment of CHO and HEK293 cells were affected in the same way as observed with sodium chlorate treatment, but not to the same extent. Indeed, effects were less pronounced following heparinase III treatment and this might be explained in part by an incomplete HS digestion rather than concluding prematurely that HS are not the main contributor for effects seen previously. Furthermore, the radical disappearance of intact HS chains at the CHO and HEK293 cell surface after LPEI and BPEI transfection as measured by flow cytometry analysis demonstrates that HS play a significant role in PEI gene transfer. Moreover, we have tested transfection efficiency in mutant CHO pgsD-677 (from ATCC<sup>®</sup>) which are deficient in both N-

acetyl-glucosaminyl-transferase and glucuronyl-transferase activities that are required for polymerization of HS. As a result, CHO pgsD-677 cells lack heparan sulfate but not chondroitin sulfate for example and were transfection deficient (data not shown).

Glypicans are one of the two major family of HSPG and are bound to the external surface of the cell membrane by a GPI anchor [242,395]. They are subject to proteolytic cleavage by a lipase called Notum [244] and studies indicate that, *in vivo*, the main function of membrane-associated glypicans is to regulate the signaling of Wnts, Hedgehogs, fibroblast growth factors and bone morphogenetic proteins (BMPs) [396–400]. Depending on the context, glypicans may have a stimulatory or inhibitory activity on signaling [242]. Besides, it has been showed that glypicans can be involved in the uptake of polyamines [401]. The role of GPCs is largely unexplored in the context of gene delivery, we thus wanted to examine the impact of membrane-associated GPCs in polyethylenimine-mediated transfection. LPEI-mediated transfection of CHO and HEK293 cells was upregulated following PIPLC treatment indicating that membrane-attached GPCs inhibit LPEI gene transfer. As polyplex uptake was increased as well, we speculate that under normal conditions (no treatment), polyplexes do bind to GPCs that might undergo proteolytic cleavage (before or after polyplex binding), thus reducing the amount of polyplexes available for internalization. In CHO cells, the elimination of GPCs increased polyplex uptake without significant change in BPEI-mediated transfection. This implies that the remaining cell-surface GAGs probably direct polyplexes into intracellular compartments that sequester polyplexes rendering them unavailable for nucleus gene delivery, and support the idea that HS inhibit BPEI-mediated transfection in CHO cells. On the contrary, PIPLC-treated HEK293 cells exhibited lower BPEI-based polyplex uptake and this correlated with a less efficient transfection compared to untreated cells. This means that GPCs are important players in BPEI gene transfer of HEK293 cells thereby adding an additional level of complexity to the role of HS in gene delivery.

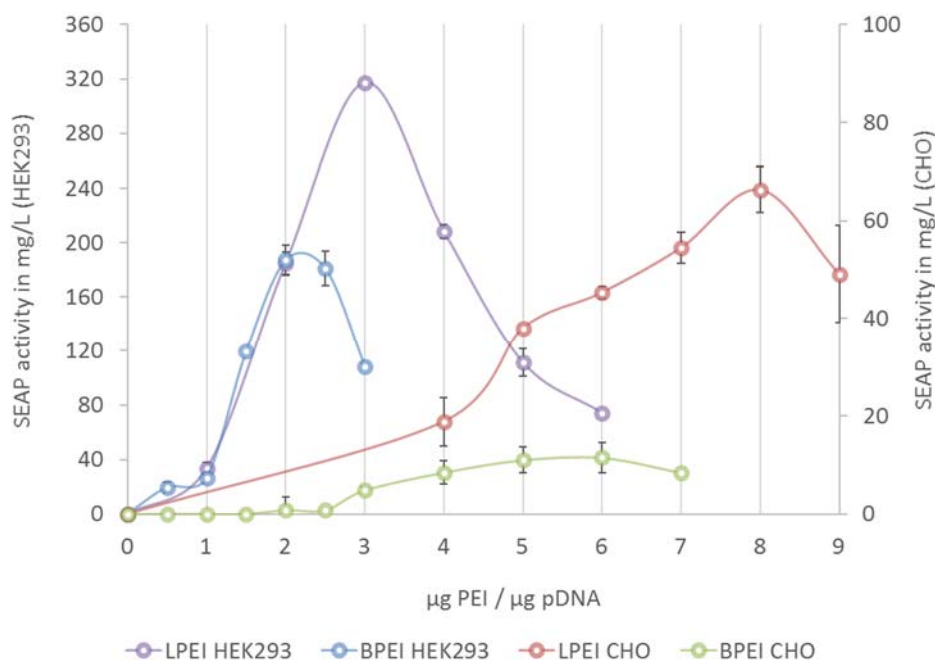
According to our observations, the elimination of GPCs might be seen as a strategy to improve transient gene expression in CHO and HEK293 cells using LPEI as a carrier. Interestingly, the yield of a secreted reporter protein (SEAP) was increased in CHO and HEK293 cells following PIPLC treatment. It was nevertheless not statistically significant in contrast to our previous

observations using BFP as a reporter gene. Further optimization of the standard procedure may be required (such as transfection scale, day of harvest, etc.).

## **Conclusion**

Taken together our results revealed that uptake of DNA complexes and subsequent transfection efficiency vary depending on the structure of PEI used as a carrier, as well as on the cell type that obviously exhibit a great variation of their overall HS composition. Sulfated GAGs including HS play an important role in PEI gene delivery and are beneficial in LPEI-mediated transfection of CHO and HEK293 cells. However, with regard to BPEI-mediated transfection of CHO cells, one could argue that sulfated GAGs inhibit the gene transfer process. This suggests that interactions between polyplexes and HSPG might be more complex and perhaps specific than generally thought. Very interestingly, we demonstrated that GPCs inhibit LPEI gene transfer in CHO and HEK293 cells. As this observation relies mainly on the use of enzymatic removal of cell-surface GPCs (loss of function), further investigations are necessary and may represent a strategy to improve cell specificity and gene delivery in CHO and HEK293 cells.

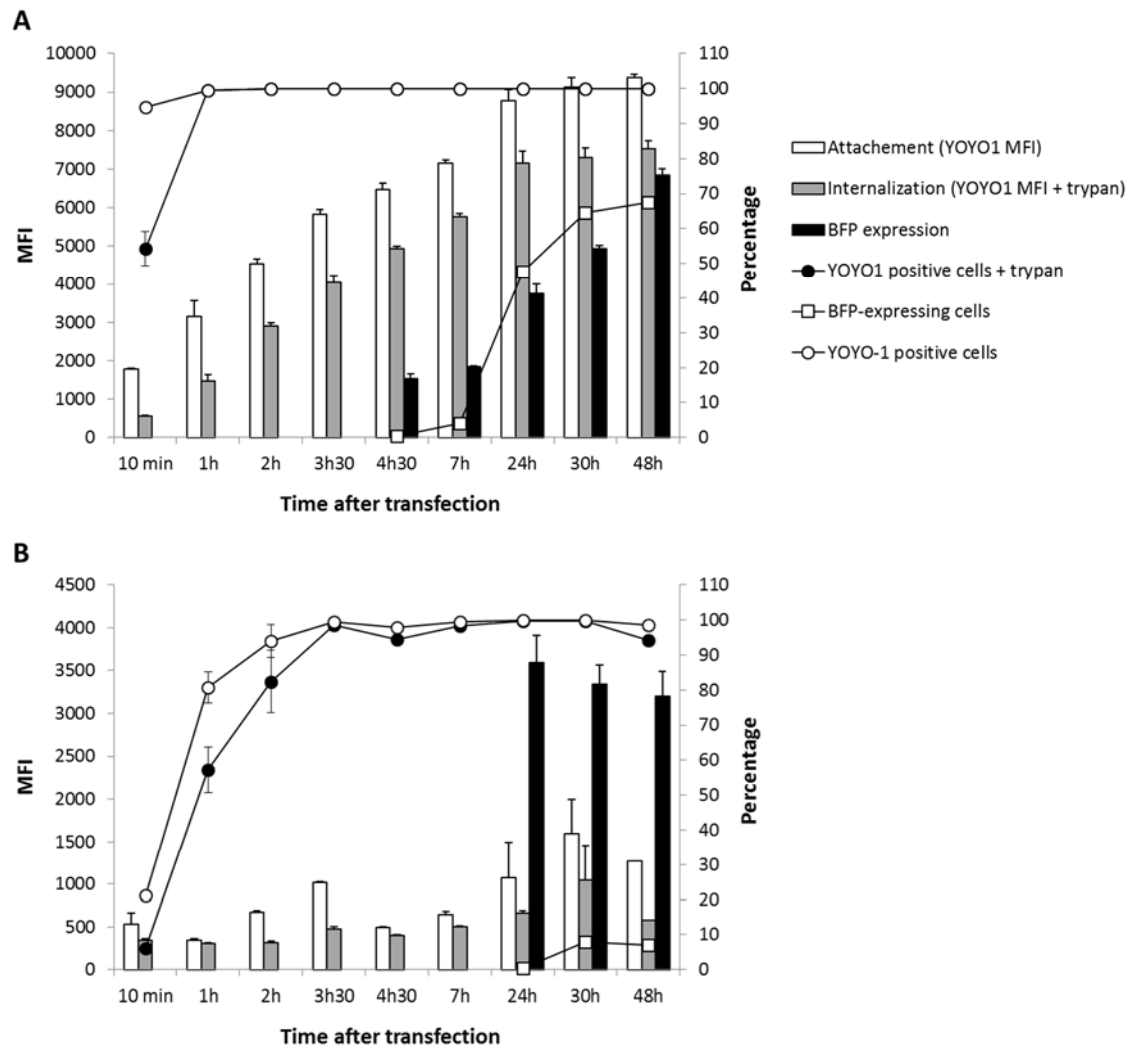
## Supplemental Data



*Figure 53 : Optimization of PEI-mediated transfection of CHO and HEK293 cells.*

*Increasing concentrations of LPEI or BPEI were used to form polyplexes with 1 μg of plasmid DNA per mL of cell culture. The SEAP present in the culture medium from CHO and HEK293 cells was determined at day 6 post-transfection and are expressed in mg of protein per L of cell culture. Mean values  $\pm$  SD were obtained from triplicate samples and the data are representative of three independent experiments. The optimal ratio for each condition were determined according to the highest SEAP activity and are summarized in table 2.*

It is important to note that, despite our efforts, poor BPEI-mediated transfection was obtained in CHO-3E7 cells. This observation was confirmed in CHO<sup>BRI</sup> cells grown in HyCell TransFx-C (Thermo Fisher Scientific) and CHO-DG44 cells grown in PowerCHO-2 CD (Lonza). Prior to B-PEI transfection of CHO-DG44 cells, medium was changed for CD-DG44 medium (Thermo Fisher Scientific) that was shown to support PEI-mediated transfection (our observations).



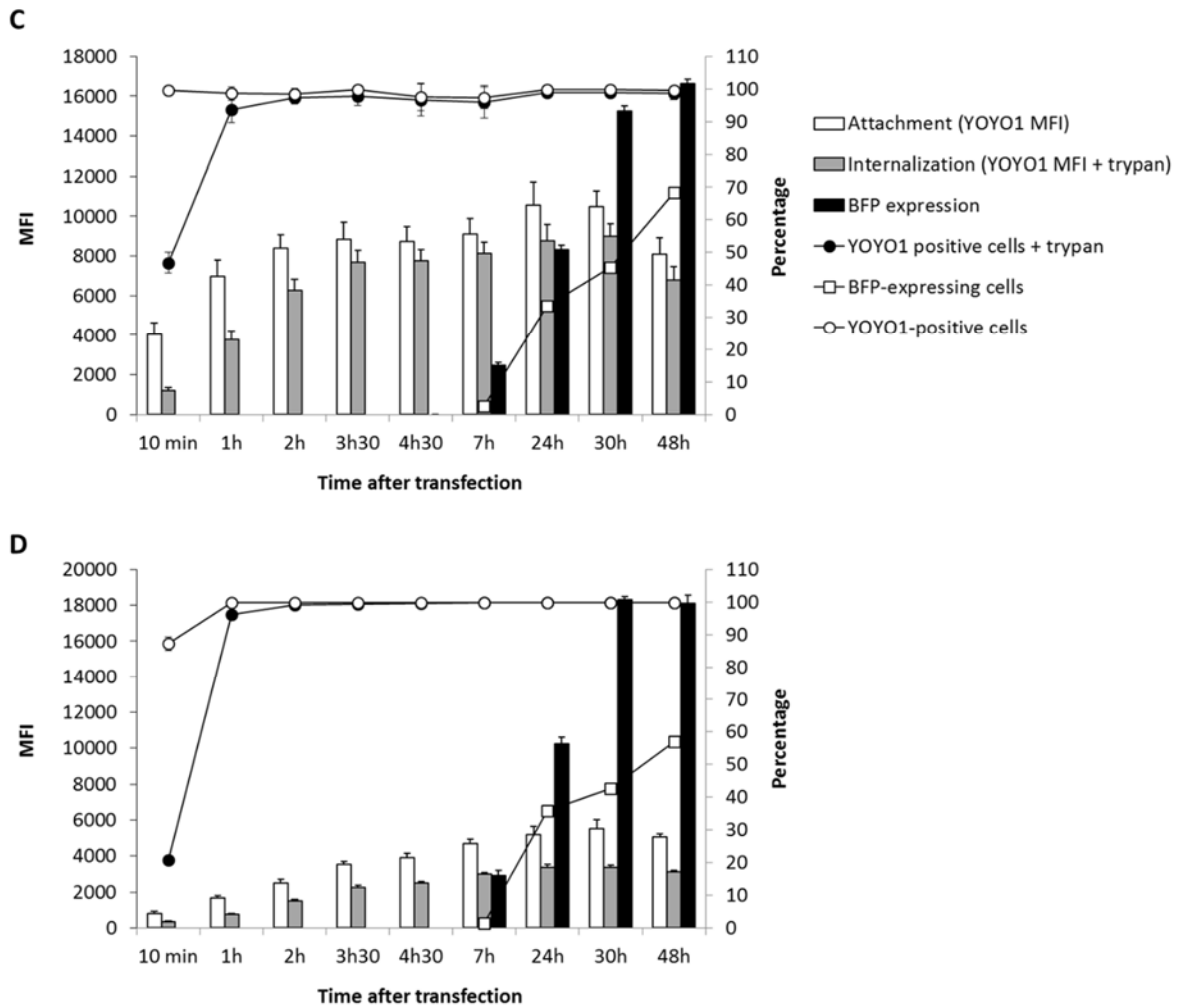
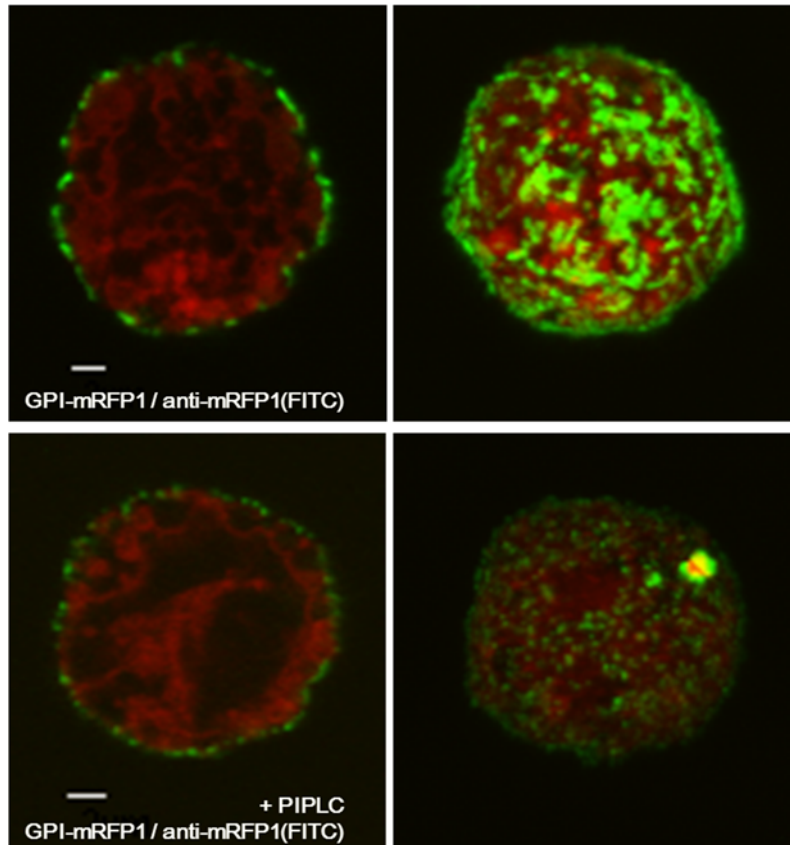


Figure 54 CD : Uptake kinetics of PEI-based polyplexes and blue fluorescent protein expression in HEK293 cells.

CHO (A and B) and HEK293 (C and D) cells were transfected with LPEI (A and C) and BPEI (B and D). Polyplexes were formed with optimal ratios (Table 2). Prior to complexation, DNA were labeled with YOYO-1. The DNA/YOYO-1 mean fluorescence intensity associated with the cells (white column), the percentage of cells with bound polyplexes (empty circles), the mean fluorescence intensity of internalized polyplexes (grey column) and percentage of cells with internalized polyplexes (filled circles) were quantified by flow cytometry. BFP was used as reporter protein to determine transfection efficiencies. The BFP mean fluorescence intensity (black column) and percentage of BFP-positive cells (empty square) were also measured by

*flow cytometry at indicated times post-transfection. Mean values  $\pm$  SD were obtained from triplicate samples and the data are representative of four independent experiments.*

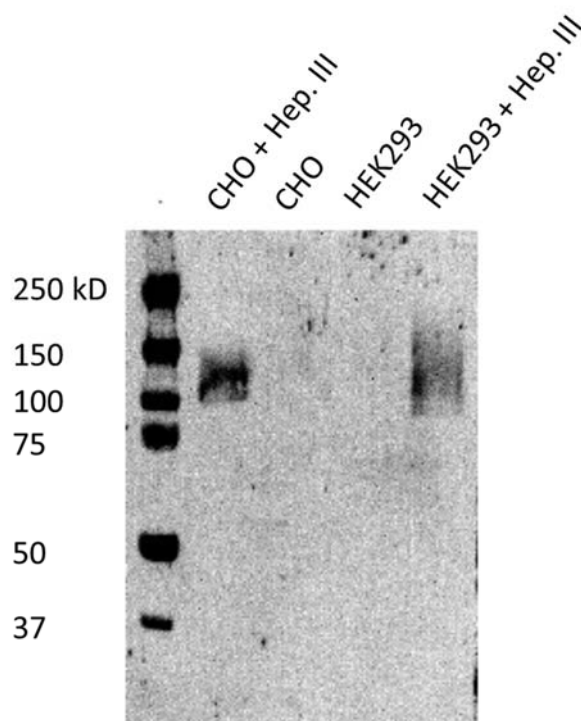
Interestingly, BPEI-mediated transfection differs drastically from the other transfections as polyplex attachment and internalization kinetics were delayed.



*Figure 55 : Efficacy of PIPLC treatment.*

*CHO and HEK293 cells were transiently transfected with a plasmid encoding for mRFP1 and consensus sequence for glycosylphosphatidylinositol (GPI) linkage at the extracellular membrane. After 24 hours, cells were treated as indicated in method section and stained with anti-mRFP1 at 1:50 for 1h (4°C) and anti-rat FITC at 1:400 for 30 min (4°C). Fluorescence images (CHO cells), selected from live cell confocal microscopy series, show a decrease in FITC intensity after PIPLC treatment. This indicates that PIPLC treatment efficiently remove GPI-anchored protein in the conditions of the experiment. Scale bar is 2  $\mu$ m.*





*Figure 56 : Heparinase III treatment.*

*CHO and HEK293 cells were treated with heparinase III as indicated in method section. Total cell extracts from treated and untreated cells were loaded on SDS-PAGE and migration was performed in MES buffer for 45 min at 200 V. Following electrophoresis, samples were transferred to a nitrocellulose membrane (1 hour at 250 V). A primary incubation (overnight at room temperature) was performed using anti-HS 3G10 antibody at 1/1000 followed by a second incubation (30 min at room temperature) with anti-mouse IgG HRP-conjugated antibody (1/4000). HRP signals were absent in untreated samples (intact HS chains) and the signals seen for treated CHO and HEK293 cells indicates the presence of partially digested HS chains (the 3G10 antibody from Seikagaku Kogyo Co. recognizes a neo-epitope generated by the heparinase III treatment).*

# **Chapitre 5 : Rôle Spécifique des Protéoglycanes à Héparane Sulfate dans le Transfert de Gène des Cellules CHO**

## **Introduction et Hypothèse de Travail**

Les syndécanes (SDC) et les glypicanes (GPC) sont des protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG) qui sont localisés à la surface de toutes les cellules de mammifères. Dans le contexte du transfert de gène, ils servent à l'attachement des polyplexes à la membrane cellulaire et influencent l'expression du transgène (rôle bénéfique ou négatif des HSPG selon le type cellulaire et la forme du PEI utilisé qui a été démontré dans le chapitre 4). Cependant leur rôle vis-à-vis du transfert de gène n'a jamais été investigué individuellement. Les HSPG membranaires arborent une charge globale négative en raison de la présence de groupements sulfates et carboxyles sur leurs chaînes polysaccharidiques. Une interaction électrostatique serait à l'origine de l'attachement des polyplexes, qui sont chargés positivement, à la surface de la cellule. L'accumulation des données concernant les protéoglycanes à héparane sulfate dans le contexte du transfert de gène indique que ces derniers seraient également impliqués dans les étapes subséquentes à celle de l'attachement des polyplexes [300,301,303,305,308]. Nous avons récemment défini le cheminement cellulaire des complexes SDC1 / polyplexes suggérant une implication active du SDC1 dans le routage intracellulaire des polyplexes (voir le chapitre 3). De plus, il a été démontré que le SDC1 et le SDC2 ont des rôles opposés vis-à-vis du transfert de gène. Alors que tous deux sont capables de lier les polyplexes, l'expression du SDC1 permet leur internalisation efficace alors que l'expression du SDC2 la retarde fortement et diminue significativement l'expression du transgène [308]. Nous avons également mis en évidence par des expériences de « perte de fonction » que les GPC présents naturellement à la surface des cellules CHO et HEK293 inhibent l'efficacité du transfert de gène par le LPEI (voir le chapitre 4). Dépendamment de son profil d'expression des HSPG, une cellule serait donc plus ou moins permissive au transfert de gène par le PEI. A la lumière de ces observations, nous émettons l'hypothèse que tous les HSPG ont la capacité de lier les polyplexes mais seuls certains sont compétents quant à leur endocytose et / ou leur cheminement vers le noyau.

## Objectif et Approches Expérimentales

L'objectif de cette étude est d'évaluer le rôle individuel de chaque HSPG dans le processus de transfert de gène et en particulier au niveau de la capture des polyplexes et leur cheminement efficace jusqu'au noyau. Pour ce faire, plusieurs approches expérimentales ont été utilisées. Premièrement, nous avons construits des vecteurs d'expression permettant d'obtenir des protéines de fusion HSPG-mRFP1 (du côté C-terminal pour les SDC et N-terminal pour les GPC). Chaque HSPG en fusion avec la mRFP1 a été exprimé de manière transitoire à la surface des cellules CHO-3E7. L'utilisation de l'étiquette mRFP1, nous permet d'identifier les cellules qui expriment les différents HSPG ainsi que leur niveau d'expression. Le système étant inductible (présence de l'opéron tétracycline décrit à la figure 57), l'effet spécifique des HSPG dans le processus du transfert de gène peut être observé en fonction de leur niveau d'expression. Deuxièmement, le domaine extracellulaire de chaque HSPG en fusion à la mRFP1 a été produit dans le but d'étudier l'impact de leur présence dans le milieu de culture sur l'efficacité du transfert de gène. En effet, les HSPG sont naturellement éliminés à la surface des cellules par un clivage enzymatique constitutif et leur accumulation dans le milieu de culture peut ainsi avoir un impact sur la transfection. Une concentration croissante de chaque domaine extracellulaire a été ajoutée dans le milieu de culture 24 heures avant la transfection des cellules par le LPEI. L'effet compétitif entre chaque domaine extracellulaire et les HSPG présents naturellement à la surface des cellules a été évalué, ainsi que la capacité de chacun à induire la dissociation des polyplexes. Troisièmement, nous avons exprimé de manière stable chaque HSPG à la surface des cellules CHO<sup>BRI</sup>-55E1 afin de corroborer et compléter les résultats des deux premières approches décrites ci-dessus.

## Méthodes Expérimentales

### Maintenance Cellulaire

Les cellules CHO-3E7 qui expriment de façon stable une forme tronquée mais fonctionnelle de l'antigène nucléaire 1 du virus Epstein Barr (EBNA1) sont maintenues en suspension et en absence de sérum dans le milieu Freestyle F17 Expression Medium (Thermo Fisher Scientific)

supplémenté avec 4 mM de L-glutamine (Sigma) et 1 g/L de Pluronic® F-68 (Thermo Fisher Scientific). Les cultures cellulaires sont maintenues en flacons ventilés (Corning Inc. Life Sciences) dans un incubateur humidifié à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub> et sous agitation continue (120 rpm).

Les différentes lignées cellulaires CHO<sup>BRI</sup>-55E1 exprimant de manière stable chaque HSPG sont maintenues en suspension et en absence de sérum et de glutamine dans le milieu HyCell TransFx-C (Thermo Fisher Scientific) supplémenté avec 50 µM de L-Méthionine Sulfoximine (MSX). Un volume total de 9 mL de culture cellulaire a été dispersé dans des plaques de six puits « profonds ». Celles-ci ont été disposées dans un incubateur humidifié à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub> et sous agitation continue (140 rpm).

La dilution des cultures est effectuée tous les deux à trois jours afin de maintenir une densité cellulaire comprise entre 0,1 et  $2 \times 10^6$  cellules / mL (phase exponentielle de croissance). La numération cellulaire et la viabilité sont déterminées à l'aide du compteur automatisé Cedex AS<sup>20</sup> (Innovatis AG) et basé sur la méthode d'exclusion du bleu trypan (Thermo Fisher Scientific). Brièvement, les cellules vivantes, ayant une membrane intacte, excluent le bleu trypan qui est une macromolécule anionique. Le bleu trypan est donc capable de pénétrer dans les cellules mortes qui apparaissent colorées en bleu. Le temps de doublement des cellules CHO-3E7 et des différentes lignées cellulaires CHO<sup>BRI</sup>-55E1 est estimé à environ 16 heures et 15 heures, respectivement.

## **Clonage Moléculaire des Constructions Plasmidiques**

### **Généralités**

Les plasmides contenant la séquence codante de chaque protéoglycane à héparane sulfate, c'est-à-dire les 4 syndécanes (SDC1-4) et 5 glypicanes (GPC1, 2, 3, 5 et 6), en fusion à la protéine fluorescente rouge monomérique (mRFP1) [355], ont été générés pour cette étude. Ces plasmides (pTT40) possèdent (i) un opéron tétracycline en aval du promoteur CMV5 (figure 57), (ii) une séquence polyA permettant d'augmenter la stabilité des ARN messagers, et (iii) une origine de réplication épisomale OriP du virus Epstein Barr permettant la réplication du

plasmide dans les cellules de mammifères exprimant EBNA1. Ils comportent également (iv) une origine de répllication bactérienne pMB1 et (v) un gène de résistance à l'ampicilline sous le contrôle d'un promoteur bactérien permettant son amplification et la sélection clonale. Nous avons également construit des plasmides contenant la séquence codante des domaines extracellulaires de chaque HSPG en fusion avec la protéine mRFP1 et les plasmides nécessaires à l'établissement des « pools » cellulaires stables (pTT75). Une liste des constructions plasmidiques et des stratégies de clonage utilisées se trouvent en Annexe 5.

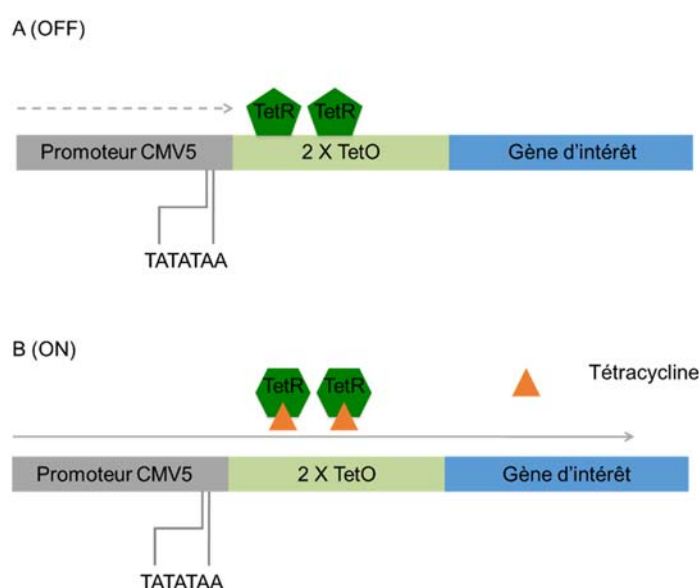


Figure 57 : Mécanisme de la commutation par la tétracycline

Le contrôle coordonné de l'expression d'un gène d'intérêt (HSPG) est possible grâce à l'opéron tétracycline. De manière générale, ce système inductible permet la transcription du gène d'intérêt en présence de tétracycline. (A) L'interaction entre le répresseur (TetR) et l'opéron tétracycline réprime l'activité du promoteur CMV5 empêchant la transcription du gène d'intérêt. (B) En présence de tétracycline (inducteur), la conformation du répresseur TetR change et prévient la liaison de ce dernier à l'opéron tétracycline. L'activité du promoteur est restaurée et la transcription du gène d'intérêt est possible.

De manière générale, le clonage moléculaire consiste à introduire un fragment d'ADN (insert) dans un vecteur plasmidique. Le plasmide « donneur » est digéré par des enzymes de restriction.

Ces dernières reconnaissent des séquences palindromiques et clivent les liaisons phosphodiester à chaque extrémité de cette séquence. L'insert est ensuite introduit dans un plasmide « receveur » (vecteur) préalablement digéré par les mêmes enzymes de restriction ou d'autres pour autant que les extrémités générées soient compatibles. L'intégration de l'insert dans le vecteur est le résultat de la ligation. Le produit final est un ADN recombinant dans le sens où il est composé d'ADN de différentes sources.

### **Digestion Enzymatique des Plasmides**

La digestion de 1 µg de plasmide est réalisée dans un volume final de 10 µL contenant 1 µL de chaque enzyme de restriction (New England Biolabs, Inc.), 1 µL de tampon NEBuffer (New England Biolabs, Inc.) et 1 µL d'albumine de sérum bovin (BSA) lorsque recommandé par le fournisseur. Les mélanges de digestion sont ensuite incubés à une température de 37°C pendant deux à douze heures dépendamment de l'efficacité et la compatibilité des enzymes de restrictions utilisées. Les produits de digestion sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% contenant 12 µg de bromure d'éthidium (BET) dans un tampon Tris / Borate / Éthylène diamine tétra-acétique (EDTA, tampon TBE). Une durée de 30 minutes à 200 V est généralement nécessaire pour la séparation adéquate des produits de digestion. La taille (en paire de bases) de chaque fragment est déterminée grâce au marqueur de poids moléculaire 1 kb DNA Ladder (Invitrogen). Enfin, les fragments d'intérêts sont découpés à l'aide d'un scalpel et purifiés avec la trousse « QIAEXII gel extraction » (Qiagen) en suivant les instructions du fournisseur.

### **Amplification par Réaction en Chaîne de la Polymérase (PCR)**

La PCR est une technique permettant d'amplifier de manière exponentielle l'ADN *in vitro* par l'action enzymatique d'une polymérase. Cette méthode a été utilisée dans le but d'amplifier les séquences d'ADN codant pour le domaine extracellulaire de chaque HSPG. Les amorces utilisées ont permis d'introduire un site de restriction AgeI du côté 5' et EcoRI du côté 3'. Chaque mélange de réaction contient 1 µL de plasmide (25 ng), 1 µL d'un mélange de dNTP (10 mM), 5 µL de tampon ThermoPol® Reaction Buffer (New England Biolabs, Inc.), 1 µL de chaque amorce (20 pmol/µl) et 0,5 µL de l'enzyme polymérase Ventr® (5U/µL). Le mélange

est complété à un volume final de 50  $\mu\text{L}$  par ajout de la quantité nécessaire d'eau milli-Q. Chaque réaction de PCR est initiée par une étape de dénaturation de l'ADN à une température de 95°C pendant 1 minute. L'hybridation des amorces est généralement réalisée à une température de 55°C pendant 1 minute. Enfin, l'élongation de l'ADN par la polymérase est effectuée à une température de 72°C dont la durée dépend de la longueur de l'ADN à amplifier. L'enchaînement de ces trois étapes définit un cycle de polymérisation qui est répété 35 fois. La purification des produits de PCR est réalisée à l'aide de la trousse « QIAquick PCR purification kit » (Qiagen) en suivant les instructions du fournisseur.

### **Digestion Enzymatique des Produits de PCR**

Les fragments d'ADN amplifiés par PCR sont digérés avec les enzymes de restriction AgeI et EcoRI. Le mélange de digestion contient 40  $\mu\text{L}$  du produit de PCR purifié et 1  $\mu\text{L}$  de chaque enzyme de restriction complété à un volume final de 50  $\mu\text{L}$  avec de l'eau milli-Q. La taille des fragments est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose (1%).

### **Ligation**

La ligation des inserts et du vecteur se fait dans un volume final de 10  $\mu\text{L}$  contenant un ratio insert/vecteur égal à 3/1, 0,5  $\mu\text{L}$  de l'enzyme T4 DNA ligase (200 unités) et 1  $\mu\text{L}$  de tampon (50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 10 mM de dithiothréitol ou DTT). Le mélange est incubé à température ambiante pendant deux heures.

### **Transformation Bactérienne**

Suite à la ligation, plusieurs recombinaisons d'ADN sont possibles d'où la nécessité de sélectionner le clone bactérien ayant intégré le plasmide d'intérêt. Pour ce faire, 10  $\mu\text{L}$  de la solution de ligation sont ajoutés à 80  $\mu\text{L}$  de bactéries compétentes *E. coli* DH5 $\alpha$ , puis le tout incubé 30 minutes sur la glace. Un choc thermique effectué à 42°C pendant 1 minute, suivi d'une incubation de 2 minutes sur la glace permet de compléter la transformation bactérienne. 90  $\mu\text{L}$  de bactéries transformées ont étéensemencés sur une gélose agar (Difco) - Circlegrow (MP Biomedicals) contenant 100  $\mu\text{g/mL}$  d'ampicilline. Une incubation à 37°C toute une nuit permet la formation de colonies bactériennes visibles à l'œil nu. Chaque colonie correspond à un clone

bactérien. On parle ici de clone car tous les individus de la colonie sont génétiquement identiques.

### **Criblage des Clones**

De manière générale, un nombre de 6 colonies isolées sont amplifiées dans 1 mL de milieu Circlegrow (MP Biomedicals) contenant 100 µg/mL d'ampicilline (Sigma). Les cultures sont incubées 6 heures à 37°C sous agitation continue (250 rpm). Le matériel génétique présents dans chaque clone est purifié à l'aide de la trousse « QIAprep Spin Miniprep » (Qiagen) en suivant les instructions du fournisseur. Les enzymes de restriction permettant de distinguer la présence de l'insert correctement intégré dans le vecteur sont sélectionnées et les produits de cette digestion sont visualisés sur gel d'agarose (1%). Enfin, le clone bactérien ayant intégré le plasmide d'intérêt est sélectionné.

### **Amplification des Plasmides**

Les plasmides sont amplifiés suite à la transformation de 50 µL de bactéries compétentes *E. coli* DH5α avec 25 ng de plasmide d'intérêt (voir le paragraphe « transformation bactérienne » pour plus de détails). Un volume de 5 µL du clone sélectionné est ajouté à 100 mL de milieu Circlegrow (MP Biomedicals) contenant 100 µg/mL d'ampicilline (Sigma). La culture bactérienne est ensuite incubée à 37°C sous agitation constante (250 rpm) toute une nuit. Les plasmides sont purifiés suivant un protocole (sous licence) développé dans notre laboratoire. La dernière étape de la purification consiste à dissoudre le matériel génétique dans un tampon TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA). Notons que de manière systématique, un aliquot de 500 µL de culture bactérienne est mélangé à 500 µL de glycérol (50%) et conservé à -80°C dans le but de créer notre banque de clones bactériens.

### **Quantification et Pureté des Plasmides**

La concentration des plasmides purifiés est déterminée par la mesure de l'absorbance à 260 nm à l'aide d'un Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). La pureté de chaque construction plasmidique est vérifiée par le rapport 260/280 et observée par électrophorèse sur gel d'agarose (1%).



## Transfection des Cellules

### Expression Transitoire des Protéoglycanes à Héparane Sulfate dans les Cellules CHO-3E7

Les cellules CHO-3E7 sont transfectées par lipofection à une densité cellulaire comprise entre 1 et  $1,5 \times 10^6$  cellules/mL. Lorsque la densité est supérieure à  $1,5 \times 10^6$  cellules/mL, celle-ci est ramenée à  $1 \times 10^6$  cellules/mL par dilution dans du milieu frais. Un volume de 1,8 mL de culture est reparti dans une plaque à six puits (Nunc). Les lipoplexes sont ensuite formulés avec la quantité de FreeStyle™ Max recommandée par le fournisseur (Thermo Fisher Scientific) et 2 µg d'un mélange d'ADNp contenant 90% d'ADNp codant pour le répresseur TetR et 10% d'ADNp codant pour chaque HSPG (figure 58). Ensuite, 200 µL de cette préparation sont ajoutés à chaque puit. Les plaques six-puits sont retournées dans un incubateur humidifié à 37°C en présence de 5% de CO<sub>2</sub> et sous agitation continue (120 rpm). Un jour après la lipofection, l'expression des HSPG a été induite par l'ajout de concentration croissante de tétracycline jusqu'à un maximum de 400 ng/mL. L'induction est poursuivie durant 24 heures en moyenne et monitorée par cytométrie en flux et microscopie de fluorescence.

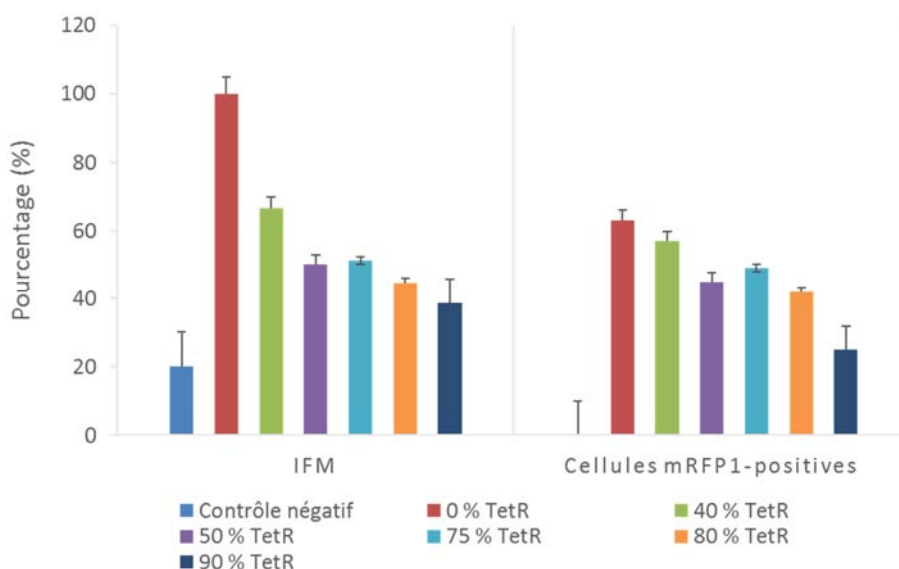


Figure 58 : Détermination du ratio répresseur / ADN d'intérêt pour l'expression transitoire de chaque HSPG.

*Le plasmide nommé pTT40-mRFP1-GPI a été utilisé dans cette expérience et permet l'expression de la protéine fluorescente mRFP1 à la surface des cellules et possédant un ancrage membranaire de type GPI. Le ratio optimal répresseur (TetR) / plasmide d'intérêt a ainsi été déterminé et indique que malgré la présence de 90% de plasmide codant pour le gène tetR, on observe une expression basale du transgène. L'intensité de fluorescence moyenne (à gauche) est exprimée en pourcentage relatif par rapport au contrôle. Le pourcentage de cellules fluorescentes à la suite de la transfection dans chacune des conditions est représentée à droite.*

### **Transfection des Cellules CHO-3E7 par le Polyéthylèneimine Linéaire**

Les cellules CHO-3E7 sont transfectées par polyfection à une densité cellulaire comprise entre  $1,5$  et  $2 \times 10^6$  cellules/mL. Lorsque la densité est supérieure à  $2 \times 10^6$  cellules/mL, celle-ci est ramenée à  $1,5 \times 10^6$  cellules/mL par dilution dans du milieu frais. De manière similaire à la lipofection, un volume de 1,8 mL de culture cellulaire est reparti dans une plaque à six puits (Nunc). Lorsque le but de la transfection est de produire le domaine extracellulaire des HSPG, les cellules sont amplifiées jusqu'à un volume de 450 mL maintenues dans un flasque de 1 L. Une quantité de 1  $\mu$ g d'ADN par mL de culture est mélangée au PEI « Max » (PolyScience) à un ratio w:w égal à 5 pour former les polyplexes. La réaction de complexation est arrêtée au bout de 10 min en ajoutant, soit 200  $\mu$ L de la préparation à chaque puit, soit 50 mL à chaque culture cellulaire de 450 mL. Les plaques six-puits ou flasques sont ensuite retournés dans un incubateur humidifié à 37°C en présence de 5% de CO<sub>2</sub> et sous agitation constante (120 rpm).

### **Cytométrie en Flux**

La cytométrie en flux, technique sur laquelle nous nous appuyons largement dans cette étude, permet l'identification de sous-population au sein d'une population complexe et hétérogène de cellules entraînées par un flux. Cette méthode d'analyse a l'avantage d'être multiparamétrique et quantitative. Elle permet d'obtenir des informations précises et significatives à condition de disposer de données suffisantes. La valeur et la précision de ces informations sont liées à la taille de l'échantillon analysé et au nombre de mesures effectuées. Ainsi chaque graphique présenté dans la section « résultats » est le fruit d'une compilation de trois expériences individuelles (au minimum) effectuées en triplicata.

Dans un premier temps, le pourcentage de cellules mRFP1 positives et l'intensité moyenne de la fluorescence ont été évalués afin de renseigner la quantité de cellules exprimant le gène de chaque HSPG (en fusion à la mRFP1) et leur niveau d'expression. Les cellules sont ensuite transfectées avec du PEI linéaire dans le but d'étudier l'impact de chaque HSPG sur l'internalisation des polyplexes et l'efficacité de transfection résultante. Pour ce faire, l'ADNp codant pour un gène rapporteur fluorescent (protéine fluorescente bleue ou BFP) a été préalablement marqué avec l'agent intercalant YOYO-1®iodide (Thermo Fisher Scientific) selon les instructions du fournisseur. Les polyplexes formés dans ces conditions sont alors visibles par cytométrie en flux et le pourcentage de cellules ayant internalisées les polyplexes ainsi que l'intensité moyenne par cellule sont analysés. L'efficacité de transfection est déterminée par le pourcentage de cellules exprimant le gène de la BFP et son intensité de fluorescence moyenne. En résumé, trois paramètres fondamentaux sont déterminés par cytométrie en flux (figure 59) à savoir, (i) le niveau d'expression de chaque HSPG dans les cellules lipofectées (mRFP1), (ii) la quantité de polyplexes internalisés (YOYO-1/FITC) dans les cellules exprimant chaque HSPG en comparaison avec les cellules négatives, i.e. n'exprimant pas d'HSPG (iii) le pourcentage de cellules exprimant chaque HSPG et le gène de la BFP *versus* le pourcentage de cellules mRFP1 négatives exprimant le gène de la BFP. Un volume de 250 à 500 µL d'échantillon est prélevé, filtré à travers un tissu Nitex 310 µm (Sefar Group) et analysé par cytométrie en flux avec les appareils BD™ LSR II ou BD LSRFortessa™ (Becton-Dickinson & Co.). Chaque détecteur collecte le signal de fluorescence et le transforme en signal électronique qui est finalement converti en signal digital. Un minimum de 10 000 cellules individuelles et vivantes sont analysées par échantillon. Le logiciel BD FACSDiva permet d'analyser les données expérimentales.

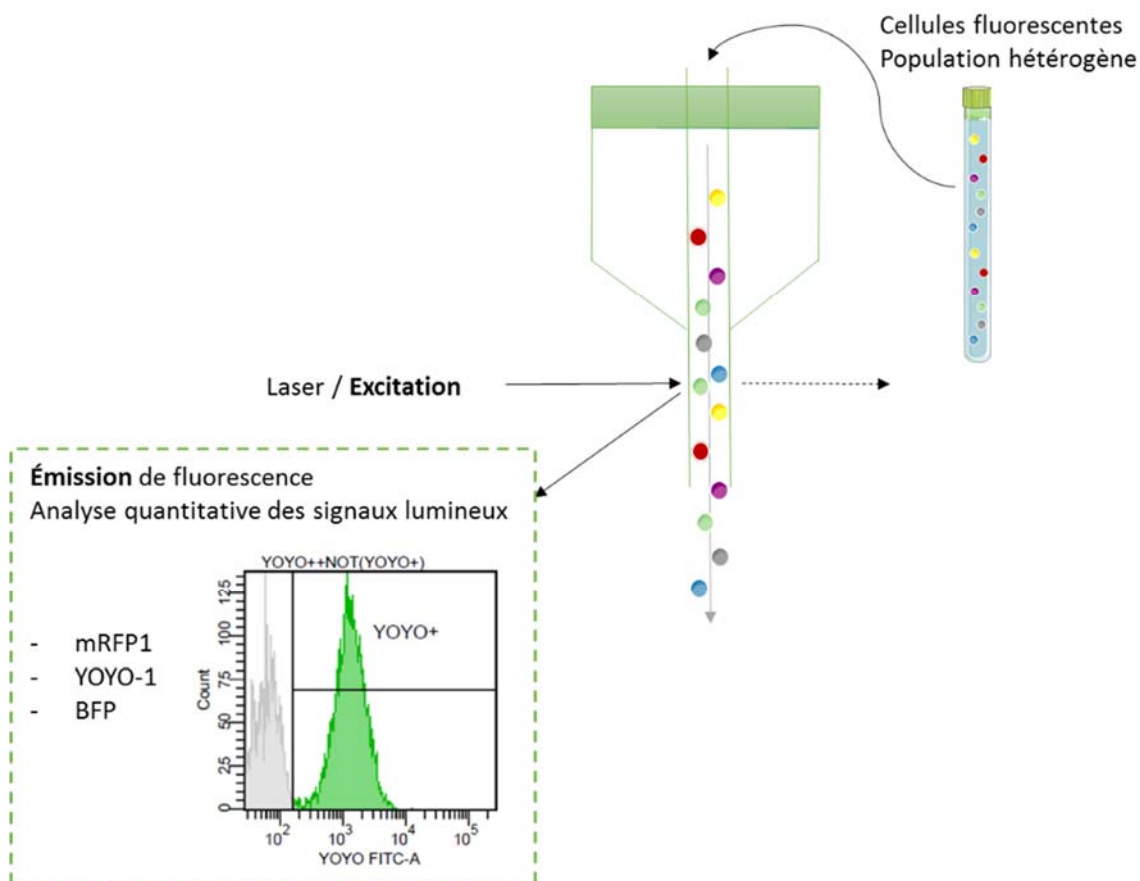


Figure 59 : Principe de la cytométrie en flux.

## Microscopie à Fluorescence

L'efficacité de transfection peut aussi être appréciée de manière qualitative par l'analyse des échantillons en microscopie à fluorescence. Ainsi les cellules exprimant soit le transgène de la mRFP1 (583/612, excitation émission maximale en nm), soit GFP (474/509), soit BFP (387/450) sont observées avec un microscope inversé Leica DMIL (équipé d'un objectif c-Plan 40 x et 10 x). L'acquisition des images est réalisée avec le logiciel IrfanView version 4.23.

## **Purification des Domaines Extracellulaires des Protéoglycanes à Héparane Sulfate**

Au jour 6 après la transfection, 500 mL (volume final) de cellules CHO-3E7 sont récoltés et les protéines d'intérêt (possédant une étiquette de huit histidines à l'extrémité C-terminale) purifiées. La purification se déroule en trois étapes (figure 60) qui sont décrites ci-après.

La première étape est une chromatographie par échange d'ions réalisée sur une colonne Fractogel® EMD  $\text{SO}_3^-$  (5 mL, Merck Millipore). La colonne est préalablement équilibrée dans un tampon phosphate salin (PBS) à pH 5. Chaque échantillon est dilué avec de l'acide acétique (0,5 M) jusqu'à atteindre un pH inférieur à 5 et déposé sur la colonne. Une étape de lavage avec le tampon PBS pH 5 permet d'éliminer quelques contaminants. L'élution des protéines d'intérêt est réalisée dans un tampon PBS pH 7,3 et collectée par fraction de 50 mL.

La seconde étape consiste en une chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés (IMAC) en utilisant une colonne Fractogel® Chelate EMD (5 mL, Merck Millipore). Cette chromatographie est basée sur l'affinité de l'étiquette Histidine (x8) pour le cobalt préalablement déposée dans la colonne. Celle-ci est équilibrée dans un tampon PBS pH 7,3 et chargée avec les fractions d'élution obtenues à la première étape de purification. Après deux lavages dans des conditions de stringence croissante. Les protéines d'intérêt liées à la colonne sont éluées dans un tampon contenant 50 mM de phosphate de sodium, 300 mM de chlorure de sodium (NaCl), 300 mM d'imidazole à pH 7. Des fractions de 1 mL sont collectées et quantifiées à l'aide du Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) afin de tracer le profil d'élution de chaque protéine.

La dernière étape de purification est une chromatographie par filtration sur gel réalisée sur une colonne Econo-Pac 10G (BioRad) et permet le « dessalage » des protéines purifiées. Un volume de 3 mL correspondant aux fractions d'élution contenant la plus haute concentration protéique est déposé sur la colonne. L'élution des protéines d'intérêt est effectuée avec 4 mL de PBS. Chaque protéine purifiée est quantifiée, filtrée (0,22  $\mu\text{m}$ ) et conservée à  $-80^\circ\text{C}$ .

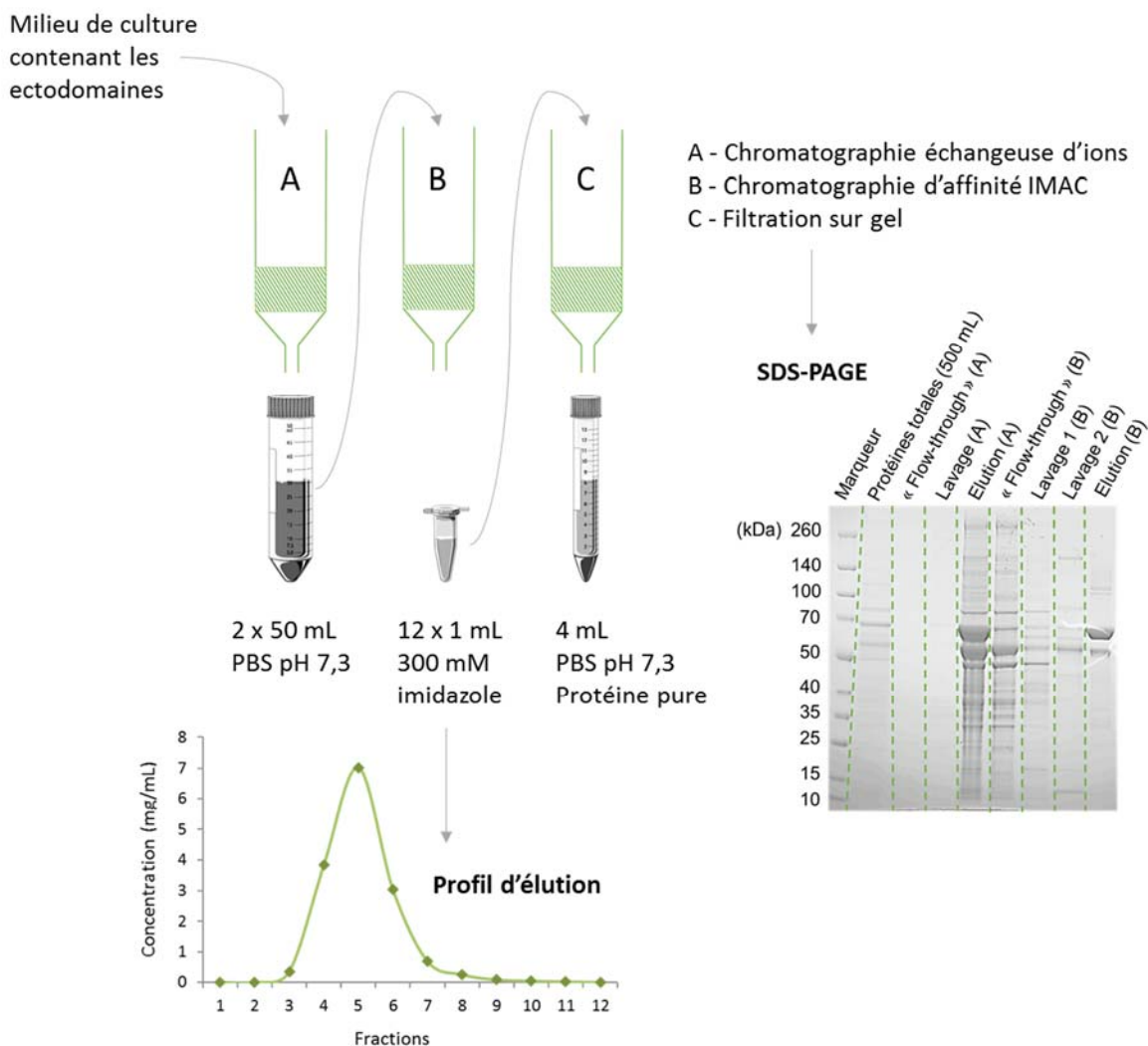


Figure 60 : Représentation schématique des étapes de la purification des ectodomaines.

## Électrophorèse sur Gel de Polyacrylamide en Présence de Dodécylsulfate de Sodium (SDS-PAGE)

Dans le but de déterminer la pureté de notre matériel protéique et d'estimer son poids moléculaire, un échantillon de chaque protéine purifiée (20  $\mu$ L contenant 2  $\mu$ g de matériel pur) est analysé par SDS-PAGE. Les échantillons sont dilués dans un tampon NuPage Sample Buffer 4X (Invitrogen) contenant 200 mM de DTT (Sigma), puis dénaturés par la chaleur (10 min à

70°C). Les échantillons et le standard de poids moléculaire Spectra™ multicolor Broad Range Protein Ladder (Fermentas Life Sciences) sont chargés dans un gel NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Gel 1,0 mm (Thermo Fisher Scientific). Le tampon MES SDS Running Buffer 1X (Thermo Fisher Scientific) est utilisé pour la migration opérée à 200 V pendant 1 heure. Après deux rinçages à l'eau Milli-Q, les gels sont baignés 15 minutes dans un tampon contenant 30% de d'éthanol, 10% d'acide acétique et 0,5% de bleu brillant de Coomassie (Sigma). Les gels sont enfin décolorés par une solution de décoloration (30% éthanol, 10% acide acétique) pendant 2 heures et plus si nécessaire.

## **Western Blot**

Dans le cas de l'immunobuvardage de type Western, 1 µg de protéines purifiées a été préalablement séparé sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante tel que décrit ci-dessus. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose 0,2 µm (Schleicher & Schuell). Le transfert est effectué dans un tampon Tris-glycine pendant 50 min à 300 mA. La membrane est saturée durant 30 minutes avec une solution de blocage contenant de la caséine et 0.1% de thimérosal (Roche Diagnostics), puis rincée dans un tampon PBS-Tween 0.1% (2 x 5 min). La membrane est placée dans un cylindre et incubée 1 heure avec une solution d'anticorps primaire de souris anti-mRFP1 (obtenu au laboratoire) dilué 1/50. La membrane est rincée à trois reprises dans de l'eau Milli-Q et le tampon PBS-Tween 0,1% (1 x 5 minutes). L'incubation de la membrane avec un anticorps secondaire anti-souris conjugué à la peroxydase (HRP, Sigma) et dilué 1/3000 finalise la méthode. Les bandes immunoréactives sont révélées par chimiluminescence et imagées à l'aide de l'appareil Kodak Digital Science Image Station 440cf (Eastman Kodak).

## **Quantification de l'ADN Double Brin par le PicoGreen®**

La trousse « Quant-iT™ PicoGreen® » (Thermo Fisher Scientific) a été utilisée en suivant les instructions du fournisseur. Brièvement, la trousse contient un réactif fluorescent sensible à l'ADN double brin permettant de mesurer des quantités de l'ordre du pg/mL à l'aide d'un spectromètre à fluorescence conventionnel. Une solution de travail doit être préparée fraîchement avant chaque expérience. Une courbe standard en 5 points couvrant des

concentrations comprises entre 20 ng/mL à 1280 ng/mL) a été réalisée avec un ADN de type plasmidique pour s'assurer une bonne corrélation avec les mesures de nos échantillons. 100 µL d'échantillon dilué 10 fois dans du tampon TE sont ajoutés à 100 µL de la solution de travail. Le mélange est incubé 5 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. La fluorescence (excitation 480 nm / émission 520 nm) est mesurée à l'aide d'un spectromètre lecteur de plaque (Gemini EM Rom v2).

## **Obtention de « Pools » Cellulaires Stables**

### **Système Inductible au Cumate**

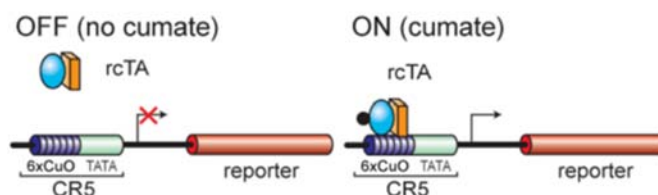
Le système inductible au cumate repose sur l'utilisation d'un opérateur cumate (CuO) et de son répresseur issu de la bactérie *Pseudomonas putida FI* (CymR) [402]. D'une part, le promoteur nommé CR5 a été obtenu suite à la fusion de la séquence génomique de l'opérateur CuO avec la boîte TATA minimale du promoteur du cytomégalo virus humain (CMV) qualifié de « fort ». D'autre part, le répresseur CymR a été fusionné au transactivateur VP16 du virus de l'herpès simplex. Le transactivateur chimérique ainsi obtenu a été nommé cTA. Celui-ci est capable de se lier à l'opérateur CuO en l'absence de cumate et permet ainsi l'expression du transgène. Cependant, cette configuration est limitante dans le sens où l'expression du transgène nécessite l'élimination du cumate. Dans le but d'induire une expression du transgène en présence de cumate uniquement, la séquence du répresseur CymR a été modifiée par mutagenèse, puis fusionnée avec le VP16 donnant naissance au transactivateur chimérique inversé rcTA. En présence de cumate (mode ON), l'expression du transgène est activée par la liaison du rcTA au promoteur CR5. En absence de cumate (mode OFF), le promoteur CR5 est libre et inactif. Notons tout de même qu'une expression basale du transgène est visible en mode OFF.

### **La Lignée Cellulaire CHO<sup>BRI</sup>-55E1**

La lignée cellulaire CHO<sup>BRI</sup> (clone 55E1), dont l'origine et le développement sont des informations confidentielles, a été utilisée afin de générer des pools cellulaires exprimant de manière stable les protéines de fusion HSPG-mRFP1. Le clone CHO<sup>BRI</sup>-55E1 est compatible



avec le commutateur cumate (figure 61) et le système de sélection basé sur le couple glutamine synthétase / L-méthionine sulfoximine (GS / MSX) détaillé plus bas.



*Figure 61 : Représentation schématique du commutateur cumate d'après Mullick A. et al., 2006 [402].*

## Transfection

La transfection de la lignée parentale CHO<sup>BRI</sup>-55E1 est la première étape en vue de l'obtention de nos différents « pools » cellulaires stables. Les cellules CHO<sup>BRI</sup>-55E1 sont donc transfectées par polyfection à une densité cellulaire comprise entre 1,5 et 2,5 x 10<sup>6</sup> cellules/mL et une viabilité supérieure à 95 %. Une quantité de 1 µg d'ADN par mL de culture est mélangée à une solution de 3 µg de PEIpro<sup>TM</sup> (Polyplus) par mL de culture. Le mélange ADN / PEI est incubé 10 minutes à température ambiante avant d'être ajouté goutte à goutte aux cellules. Ces conditions de transfection des cellules CHO<sup>BRI</sup>-55E1 maintenues dans le milieu de culture HyCell TransFx-C (Thermo Fisher Scientific) ont été préalablement évaluées comme étant optimales. Les cellules sont transfectées avec les différentes constructions plasmidiques obtenues à cet effet (voir la liste en Annexe 5 et l'efficacité de transfection résultante à la figure 62). Le plasmide pTT75 est un dérivé du plasmide pTT qui a été précédemment développé afin de favoriser l'expression stable des r-protéines dans les cellules CHO<sup>BRI</sup>-55E1. Les cellules transfectées sont ensuite retournées dans un incubateur humidifié à 37°C en présence de 5 % de CO<sub>2</sub> et sous agitation constante (120 rpm).

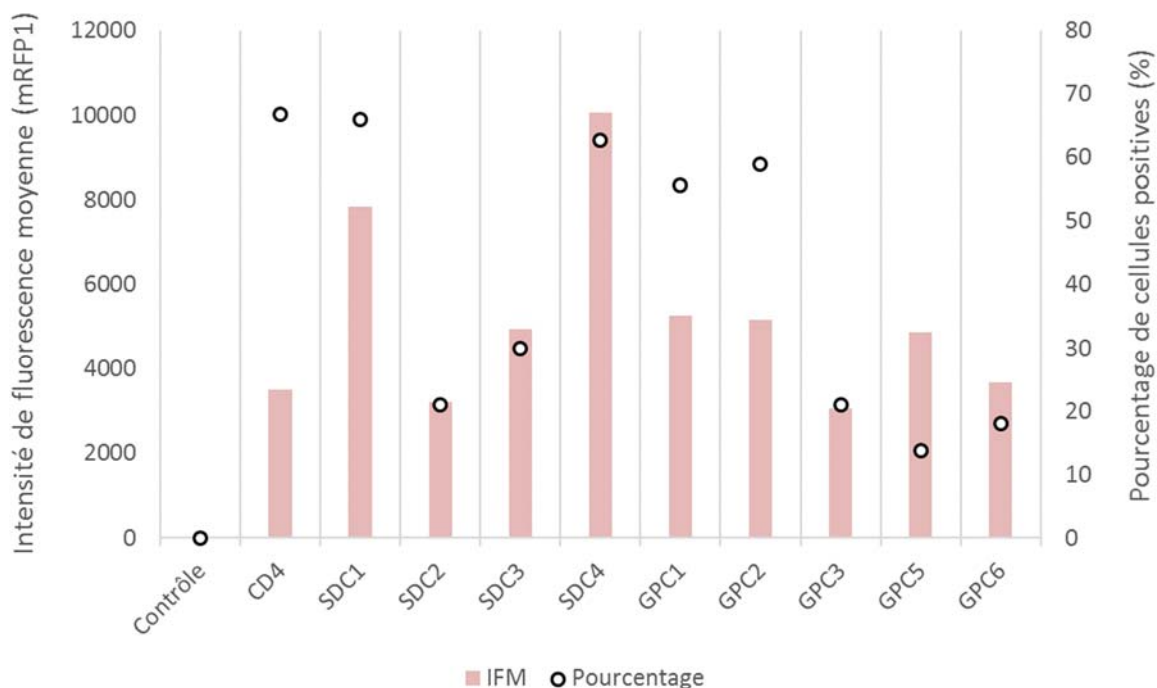


Figure 62 : Transfection initiale des cellules  $CHO^{BRI-55E1}$ .

### Système de Sélection GS / MSX

La sélection des cellules ayant intégrées le plasmide (contenant le transgène et un gène de résistance) est une étape nécessaire car l'intégration chromosomique dans le génome de la cellule hôte est un événement très rare. Pour ce faire, on applique une pression de sélection qui permet d'éliminer les cellules n'ayant pas intégré de manière stable le plasmide. Le système de sélection employé dans cette étude est basé sur l'expression du gène de la glutamine synthétase (GS) et a été développé à l'origine par *Lonza Biologics* (Slough, UK). L'enzyme GS est responsable de la synthèse de la glutamine à partir du glutamate et de l'ammoniac ( $NH_3$ ). Il s'agit de l'unique voie de synthèse de la glutamine dans les cellules de mammifères. Celle-ci est généralement ajoutée dans le milieu de culture afin de supporter les besoins des cellules cependant, en absence de glutamine, la survie des cellules dépend de cette voie métabolique. Ainsi dans un milieu sans glutamine et en présence d'un inhibiteur de l'enzyme GS endogène

(MSX), les cellules ne parviennent pas à survivre. Par contre, dans le cas où une copie du gène GS est intégré dans une cellule, cette dernière est capable de survivre dans un milieu non supplémenté en glutamine et contenant du MSX [403].

Un jour après la transfection de la lignée parentale CHO<sup>BRI</sup>-55E1, le milieu de culture HyCell TransFx-C est supplémenté avec une concentration finale de 50  $\mu$ M de MSX. La densité de cellules viables est évaluée tous les jours. Durant la phase de sélection, on observe une diminution drastique de la viabilité cellulaire. Une fois que la viabilité atteint 95% et que le temps de doublement des « pools » cellulaires est constant d'un passage à l'autre, un échantillon de 1 mL est cryo-préservé dans un mélange de milieu (HyCell TransFx-C) additionné de 10% (v/v) de diméthylsulfoxyde (DMSO).

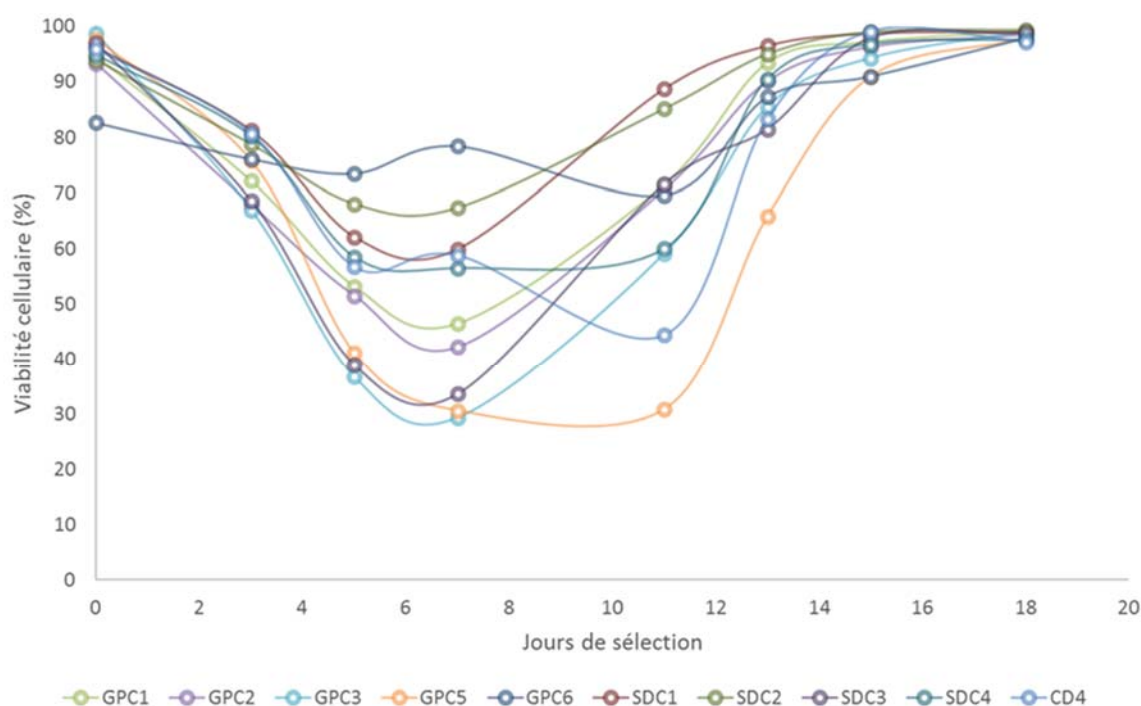


Figure 63 : Phase de sélection des « pools » cellulaires exprimant de manière stable chaque protéoglycane à héparane sulfate.

La phase de sélection peut durer entre 2 à 3 semaines (figure 63) et permet d'obtenir un « pool » cellulaire résistant qui exprime chaque protéine de fusion HSPG-mRFP1. Les « pools » cellulaires sont constitués d'une population hétérogène de cellules exprimant plus ou moins fortement le transgène dépendamment du nombre de copie du gène intégré dans le génome de la cellule hôte, et / ou de la position de ces copies dans le génome. Afin d'assurer la stabilité des « pools » cellulaires, la pression de sélection est maintenue pendant toute la durée de l'étude. Notons qu'un test préalable a permis de conclure que la présence de MSX dans le milieu de culture n'affecte pas l'efficacité du transfert de gène.

## **Résultats**

### **Niveau d'Expression des Protéoglycanes à Héparane Sulfate**

Dans le but d'évaluer l'effet de l'expression transitoire de chaque HSPG sur la capture des polyplexes, les cellules CHO-3E7 ont été transfectées avec les différentes constructions plasmidiques prévues à cet effet (Annexe 5). L'intensité de fluorescence de la protéine mRFP1 a été déterminé par cytométrie en flux en présence ou en absence d'inducteur (la tétracycline). Celle-ci nous renseigne sur le niveau d'expression moyen d'un HSPG dans les cellules CHO-3E7. Afin de vérifier que la présence de tétracycline dans le milieu de culture n'induit pas une fluorescence indésirable, des cellules non transfectées (contrôle) en présence de concentration croissante de tétracycline ont été analysées de manière analogue. Les résultats indiquent que la présence de tétracycline n'induit pas de fluorescence spontanée par opposition à la fluorescence apportée à la cellule par le fluorochrome mRFP1. Le niveau d'expression de chaque HSPG en fusion la mRFP1 en mode induit ou non est présenté à la figure 64A (voir l'Annexe 6 pour l'observation en microscopie). En absence d'inducteur, on observe une expression basale des différents HSPG-mRFP1 dans les cellules. Une augmentation de leur niveau d'expression est observée suite à l'induction, bien que celle-ci ne soit pas nécessairement proportionnelle à la concentration de tétracycline utilisée. Il est important de noter que l'analyse par cytométrie en flux ne permet pas de discriminer la fluorescence membranaire de la fluorescence intracellulaire. De ce fait, l'augmentation de la fluorescence moyenne observée n'indique pas nécessairement un accroissement de la présence des HSPG à la surface des cellules. En effet, une fois la

membrane plasmique saturée en HSPG, l'élévation du signal pourrait être due à l'augmentation de la fluorescence au niveau intracellulaire. Cependant, l'analyse par microscopie à fluorescence permet de vérifier que les HSPG-mRFP1 surexprimés sont bien localisés à la membrane cellulaire (figure 64B) dans les conditions de l'expérience.

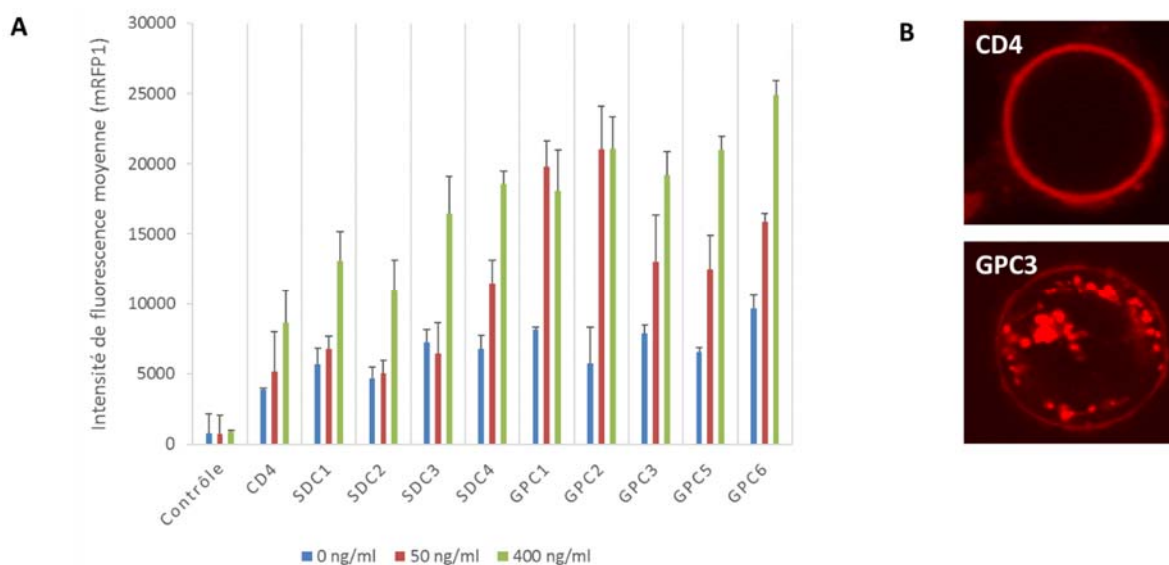


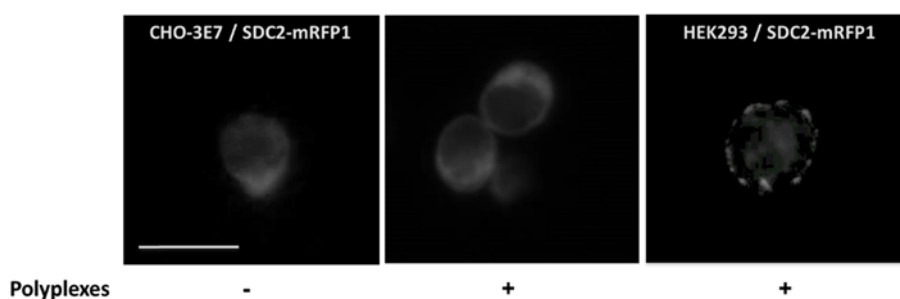
Figure 64 : Expression transitoire de chaque protéoglycane à héparane sulfate.

(A) Niveau d'expression moyen de chaque HSPG dans les cellules CHO-3E7 en absence (0 ng/mL) ou présence (50 ng/mL et 400 ng/mL) de l'inducteur tétracycline et (B) localisation membranaire de CD4-mRFP1 et GPC3-mRFP1.

De manière générale, plusieurs contrôles expérimentaux vont nous accompagner durant cette étude principalement basée sur la méthode de cytométrie en flux : (i) un contrôle de cellules non transfectées qui permet de détecter le signal de base, (ii) l'effet de l'expression transitoire de chaque HSPG est comparé au « pool » de cellule ne les exprimant pas et consiste en un contrôle expérimental interne (lors de la transfection transitoire une partie des cellules expriment le transgène et l'autre non), (iii) et enfin un contrôle permettant de s'affranchir de l'impact de l'expression transitoire d'une protéine membranaire et de la présence du fluorochrome mRFP1 : le CD4 (mRFP1 du côté N-terminal) est une glycoprotéine transmembranaire ne possédant pas de chaînes d'héparanes sulfates.

## Effet de l'Expression Transitoire des Protéoglycanes à Héparane Sulfate sur la Capture des Polyplexes

D'après nos observations antérieures, l'ajout de polyplexes induit un regroupement de SDC1 et SDC2 à la membrane cellulaire facilitant ou non l'endocytose des polyplexes ([308] et chapitre 3). Dans le but de déterminer ce qu'il en est pour les cellules CHO-3E7, nous avons observé par microscopie à fluorescence la redistribution des HSPG à la surface des cellules après l'ajout des polyplexes. Cependant, ce phénomène n'a pu être observé pour les cellules CHO-3E7 comme illustré à la figure 65 (exemple du SDC2). Ceci indique que l'endocytose des polyplexes dans les cellules CHO-3E7 n'impliquerait pas le regroupement des HSPG suggérant la mise en place d'un autre mécanisme. Sans émettre de conclusion hâtive sur l'efficacité de ce mécanisme, on pourra rappeler que les cellules CHO-3E7 produisent jusqu'à 10 fois moins de r-protéines que les cellules HEK293 transfectées dans les mêmes conditions [53].



*Figure 65 : Regroupement de SDC-2 à la surface des cellules CHO-3E7 et HEK293. Les cellules CHO-3E7 et HEK293 ont été transfectées avec la construction plasmidique pTT40-hSDC2-mRFP1 et l'agent de transfection FS-MAX. Les polyplexes à base de LPEI ont ensuite été ajoutés aux cultures cellulaires et l'organisation spatiale du SDC-2 présents à la surface des cellules observée avec un microscope à fluorescence. Échelle : 15  $\mu$ m.*

Nous avons ensuite investigué la capacité des cellules exprimant un HSPG spécifique à internaliser les polyplexes à base de LPEI. Le vecteur d'expression ayant été préalablement marqué avec un l'agent intercalant YOYO-1, il est ainsi possible de suivre l'internalisation et l'accumulation des polyplexes dans les cellules par cytométrie en flux. De plus, nos études

cinétiques [53] indiquent qu'à 24 heures après la transfection, l'internalisation des polyplexes est complète et correspond à la quantité maximale d'ADNp dans les cellules CHO-3E7. Nous avons donc choisi d'analyser la capture des polyplexes par les cellules exprimant chaque HSPG après 24 heures suivant la transfection. Les résultats présentés à la figure 66 indiquent la variation de l'intensité moyenne de fluorescence (YOYO-1) par rapport au contrôle de cellules non transfectées. Nos résultats indiquent que l'internalisation des polyplexes dans la cellule est augmentée significativement en présence de SDC1, SDC2, SDC3, et GPC2, GPC5, GPC6 à la surface des cellules CHO-3E7. Par opposition, la présence de GPC1, GPC3 et SDC4 à la surface des cellules diminue l'internalisation des polyplexes. De manière intéressante, on observe que l'augmentation du niveau d'expression des HSPG suite à l'induction ne se traduit pas systématiquement par un renforcement de leur rôle inhibiteur ou activateur de la capture des polyplexes.

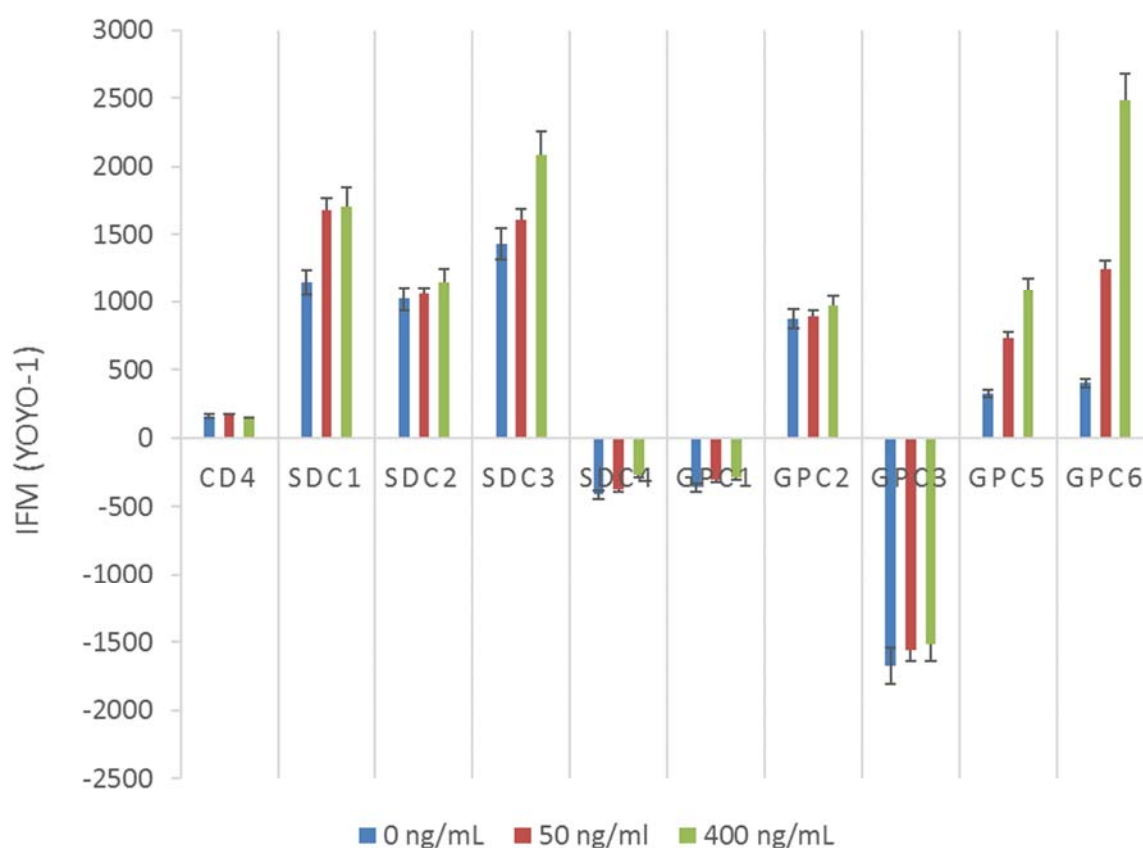


Figure 66 : Effet de l'expression transitoire des HSPG sur l'internalisation des polyplexes.

## **Effet de l'Expression Transitoire des Protéoglycanes à Héparane Sulfate sur l'Expression du Transgène**

L'efficacité de transfection a été évaluée grâce à l'expression du gène rapporteur codant pour la BFP. En effet, le pourcentage de cellules doublement fluorescentes (i.e. coexprimant un HSPG-mRFP1 et la BFP) a été déterminé par cytométrie en flux. Seulement 5% des cellules de la culture expriment le gène rapporteur 48 heures après la transfection (exemples à la figure 67). Ces résultats ne permettent donc pas de fournir des analyses statistiquement solides afin de conclure quant à l'effet de l'expression transitoire d'un HSPG sur l'expression du transgène. Suite à ces observations, les cellules CHO-3E7 ont été transfectées avec un ADNp codant pour la protéine SEAP. Cette dernière a l'avantage de s'accumuler dans le milieu de culture au cours du temps, étant sécrétée par les cellules transfectées. L'activité de la protéine SEAP peut être facilement mesurée par spectroscopie et est directement proportionnelle à la quantité intracellulaire de protéine et de son ARNm. En accord avec nos résultats antérieurs, nous avons observé une faible activité de la protéine SEAP produite par les cellules exprimant de manière transitoire chaque HSPG.

Par la suite, nous avons déployé une quantité importante d'efforts afin de contourner ce biais expérimental. Plusieurs approches ont été développées pour tenter d'exprimer de manière transitoire chaque HSPG à la surface des cellules CHO-3E7 sans prévenir leur transfection subséquente par le LPEI. Nous avons procédé à un changement de milieu de culture dans le but de réduire la formation d'agrégats, espacer le temps entre les deux transfections, utiliser l'agent lipidique Lipofectamine® (Thermo Fisher Scientific), le vecteur viral BacMam (un baculovirus recombinant) et l'électroporation. Chacune de nos tentatives a permis d'exprimer les HSPG-mRFP1 à la surface des cellules mais leur transfection subséquente n'était pas efficace. Dans les conditions habituelles de transfection, plus de 50% des cellules CHO-3E7 expriment la BFP [53]. Il est probable que la transfection / transduction / électroporation induisent une phase de latence au niveau de la croissance cellulaire prévenant une transfection subséquente. Soutenant notre hypothèse, Sylvia Brunner et ses collaborateurs [202] démontrent que l'efficacité du transfert de gène par les lipoplexes et les polyplexes est dépendante du cycle cellulaire. Ainsi le niveau d'expression de la luciférase est augmenté de 30 à 500 fois lorsque les cellules sont



préalablement synchronisées en phase S/G2 (proche de la mitose) en comparaison des cellules en phase G1. Il existe quelques exemples dans la littérature investiguant l'efficacité de transfections répétées, essentiellement dans le contexte de la thérapie génique. In vivo, la transfection répétée des cellules épithéliales des voies aériennes par le LPEI (22kDa) révèle que l'efficacité de la première transfection n'est jamais égalée. Seulement 10 et 49% de l'efficacité initiale est obtenue à la suite d'une seconde transfection réalisée après 7 et 25 jours respectivement [118]. Cette diminution de l'efficacité serait le résultat d'un processus inflammatoire induit par des cytokines en réponse aux motifs CpG largement présents dans l'ADN bactérien [404]. Notons tout de même qu'une transfection préalable des cellules CHO-3E7 ne prévient pas l'endocytose des polyplexes lors de la seconde transfection puisque plus de 95% des cellules ont internalisées des polyplexes.

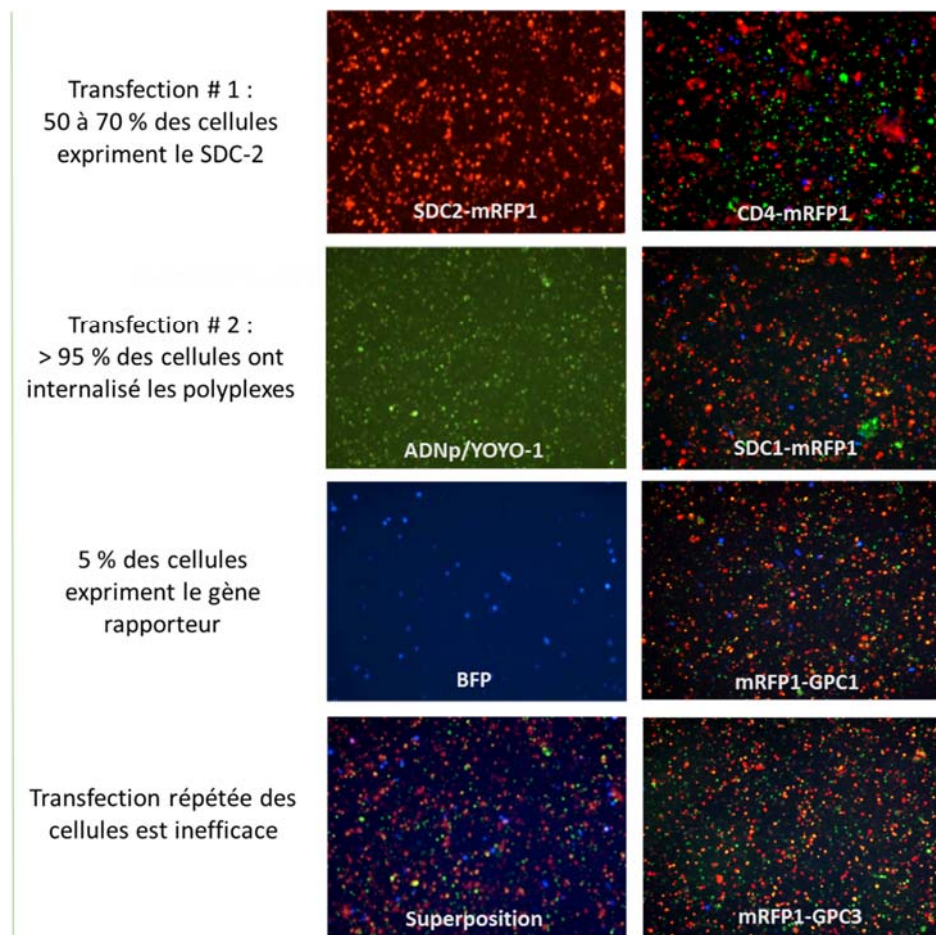


Figure 67 : La transfection par le FS-MAX prévient une transfection subséquente par le LPEI.

## **La Présence des Domaines Extracellulaires dans le Milieu de Culture Réduit l'Efficacité du Transfert de Gène**

Le processus de renouvellement naturel des HSPG fait intervenir un clivage enzymatique de leur protéine centrale libérant les domaines extracellulaires (ectodomaines) intacts et solubles dans la matrice extracellulaire. Il est donc probable que l'expression transitoire des HSPG à la surface des cellules CHO-3E7 induise une augmentation de la concentration des ectodomaines dans le milieu de culture. Ces derniers peuvent éventuellement interférer avec le processus de transfert de gène par le PEI. En effet, les ectodomaines sont capables de lier et neutraliser les polyplexes, entrant ainsi en compétition avec les HSPG présents naturellement à la surface des cellules CHO-3E7. Dans le but de déterminer dans quelle mesure la présence des ectodomaines dans le milieu de culture interfère avec le transfert de gène, ils ont été produits dans les cellules CHO-3E7 (figure 68), puis ajoutés dans le milieu de culture 24 heures avant la transfection à des concentrations croissantes allant jusqu'à 40 µg d'ectodomaines par millilitre de culture. Les protéines CD4 et mRFP1 ont été utilisées comme références. Deux paramètres ont été évalués à savoir, l'internalisation des polyplexes et l'expression du transgène de la BFP à 24 et 48 heures suivant la transfection, respectivement.

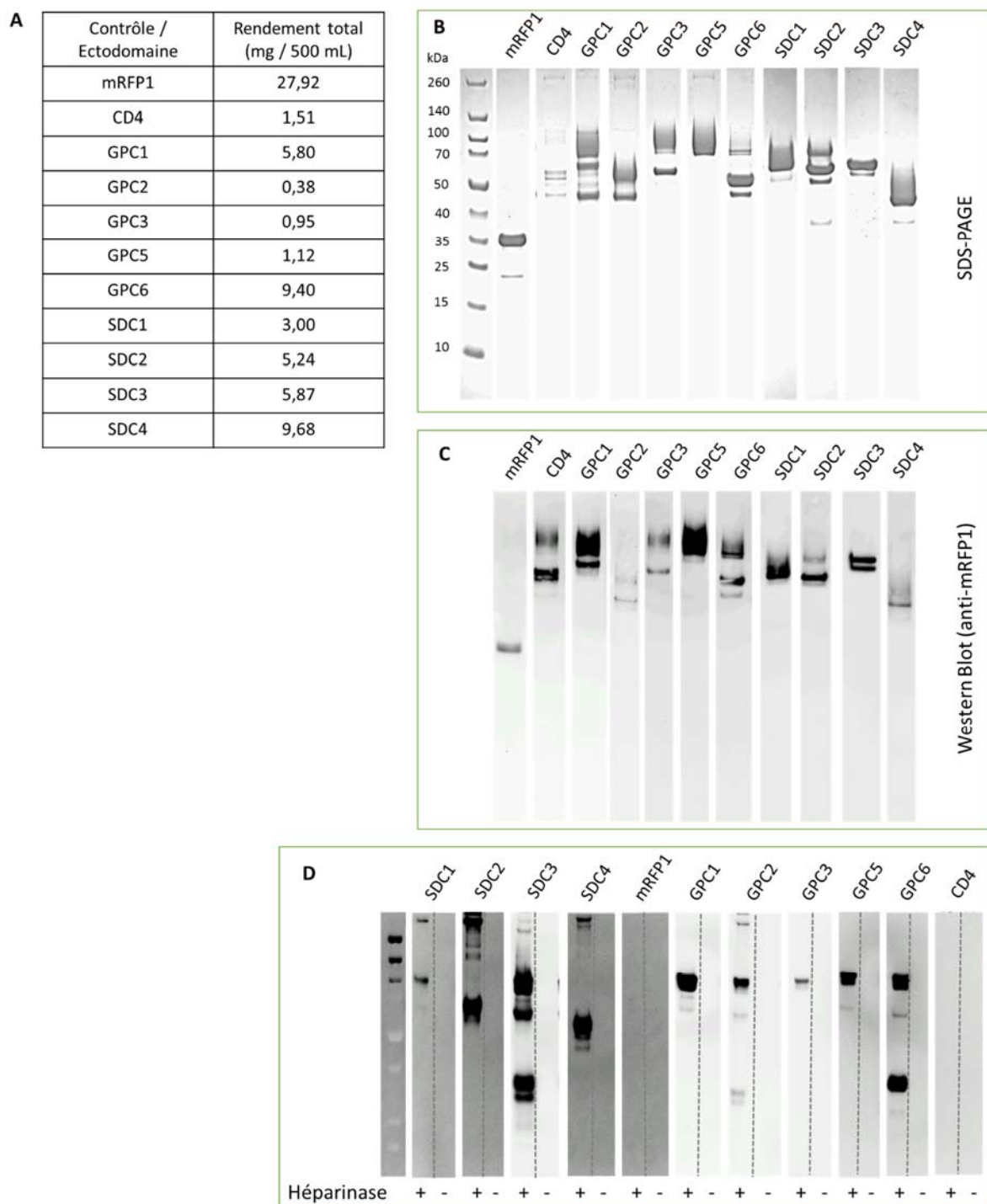


Figure 68 : Production des ectodomaines des protéoglycanes à héparane sulfate. Chaque HSPG a été produit dans les cellules CHO-3E7 et purifié tel qu'indiqué dans la section « méthodes expérimentales » (A : rendements de production). (B) Un échantillon de chaque

*préparation contenant 1,8 µg d'HSPG purifié a été analysé par électrophorèse en condition dénaturante. Le bleu de coomassie a été utilisé pour colorer et visualiser les HSPGs. (C) Le contenu en protéines d'intérêt a été évalué suite au transfert western en utilisant les anticorps anti-mRFP1 et anti-mouse IgG couplé à la peroxydase du raifort (HRP). (D) La présence de chaînes d'héparanes sulfates a été confirmée suite au traitement de 1,8 µg d'ectodomaines par l'enzyme héparinase III. Le néo-épitope généré par l'héparinase III a été détecté en utilisant les anticorps 3G10 et anti-mouse IgG couplé à la HRP. La présence des chaînes d'héparanes sulfates est ainsi confirmée lorsqu'un signal est observé.*

Nos résultats révèlent que la présence de mRFP1 et de l'ectodomaine CD4 n'affecte pas l'internalisation des polyplexes (figure 69). De manière surprenante, les ectodomaines SDC2 et SDC3 n'ont également pas d'effet significatif sur l'internalisation des polyplexes. Par contre, en présence de concentrations croissantes des ectodomaines SDC1, SDC4, GPC1, GPC2, GPC3, GPC5 et GPC6, une réduction systématique de l'internalisation des polyplexes est observée. En présence de SDC1, SDC4 et GPC1, seulement une haute concentration d'ectodomaine affecte l'internalisation des polyplexes. Ces résultats nous informent sur le degré d'affinité de chaque ectodomaine pour les polyplexes et indiquent que ceux de SDC1, SDC4, GPC1, GPC2, GPC3, GPC5 et GPC6 ont une affinité pour les polyplexes contrairement aux ectodomaines SDC2 et SDC3. Parmi les différents ectodomaines celui de GPC2, GPC3 et GPC6 exhibent la plus forte affinité pour les polyplexes diminuant de manière drastique leur capture par les cellules. Afin de clarifier la signification de ces résultats prenons comme exemple le GPC3 et GPC6. Premièrement, lorsque le GPC3 est exprimé à la surface des cellules, on remarque une inhibition de l'internalisation des polyplexes. De plus, l'ectodomaine GPC3 arbore une forte affinité pour les polyplexes diminuant leur attachement et de ce fait leur internalisation dans les cellules. GPC3 serait donc capable de lier les polyplexes mais cette interaction ne permettrait pas leur internalisation efficace. Il est possible que celle-ci soit retardée (comme c'est le cas avec SDC2 dans les cellules HEK293 [308]) ou bien annulée par le clivage de l'ectodomaine GPC3 (effet antagoniste, page 49). Deuxièmement, lorsque le GPC6 est exprimé à la surface des cellules, on remarque un bénéfice significatif au niveau de l'internalisation des polyplexes. Lorsque les ectodomaines GPC6 sont présents dans le milieu de culture, on observe une forte affinité pour les polyplexes. Ceci suggère que le GPC6 serait capable de lier les polyplexes et d'induire leur

internalisation efficace. Dans le cas où aucun effet n'est notable au niveau de l'internalisation des polyplexes en présence d'ectodomaines dans le milieu de culture (SDC2 et SDC3), cela ne signifie pas pour autant qu'ils ne soient pas capables de lier les polyplexes. En effet, l'affinité de ces ectodomaines n'est simplement pas assez importante pour affaiblir l'attachement des polyplexes aux HSPG présents naturellement à la surface des cellules CHO-3E7.

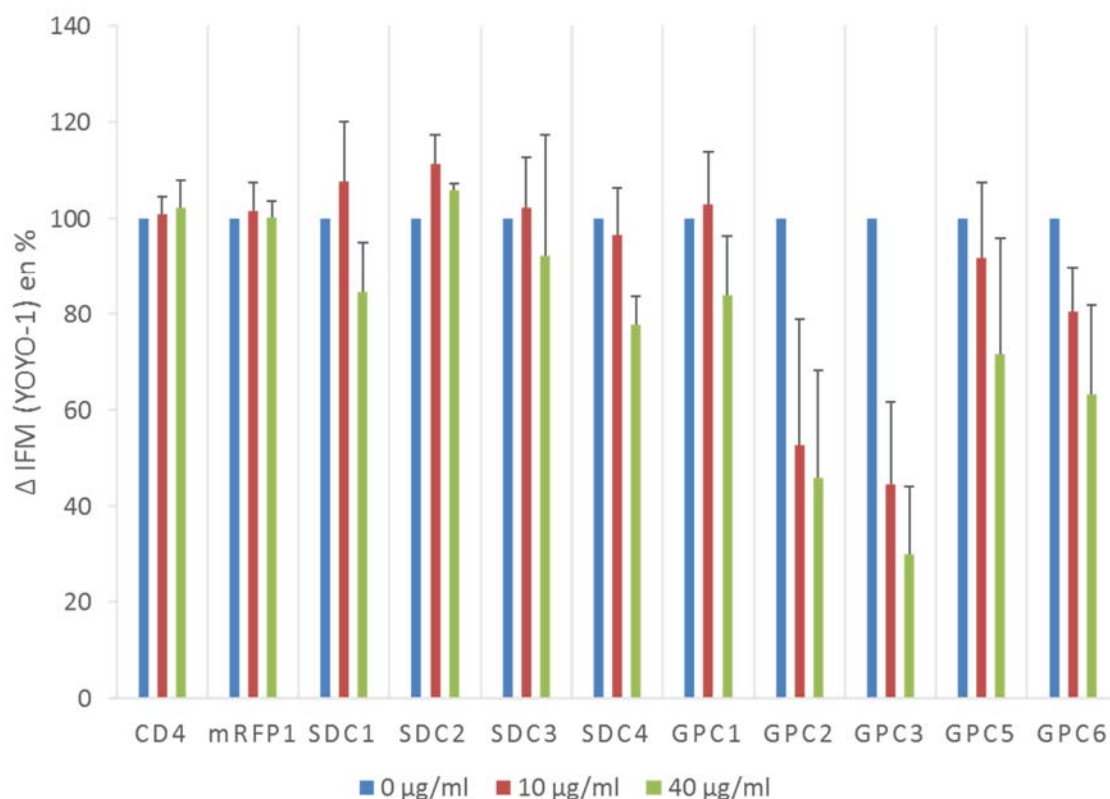


Figure 69 : Domaines extracellulaires des HSPG et internalisation des polyplexes.

De manière intuitive, la réduction de l'internalisation des polyplexes devrait affecter proportionnellement l'expression du transgène. C'est pourquoi l'effet de la présence des ectodomaines dans le milieu de culture sur le pourcentage des cellules exprimant le transgène a été déterminé (figure 70). L'ajout de mRFP1 et l'ectodomaine CD4 dans le milieu de culture n'a pas d'effet sur l'expression du transgène comme on pouvait s'y attendre. De plus, à l'exception du SDC2 et SDC3, l'ajout des différents ectodomaines dans le milieu de culture aboutit à une réduction du pourcentage de cellule exprimant le transgène. Ces résultats

corroborent nos observations relatives à l'internalisation des polyplexes en présence des ectodomaines.

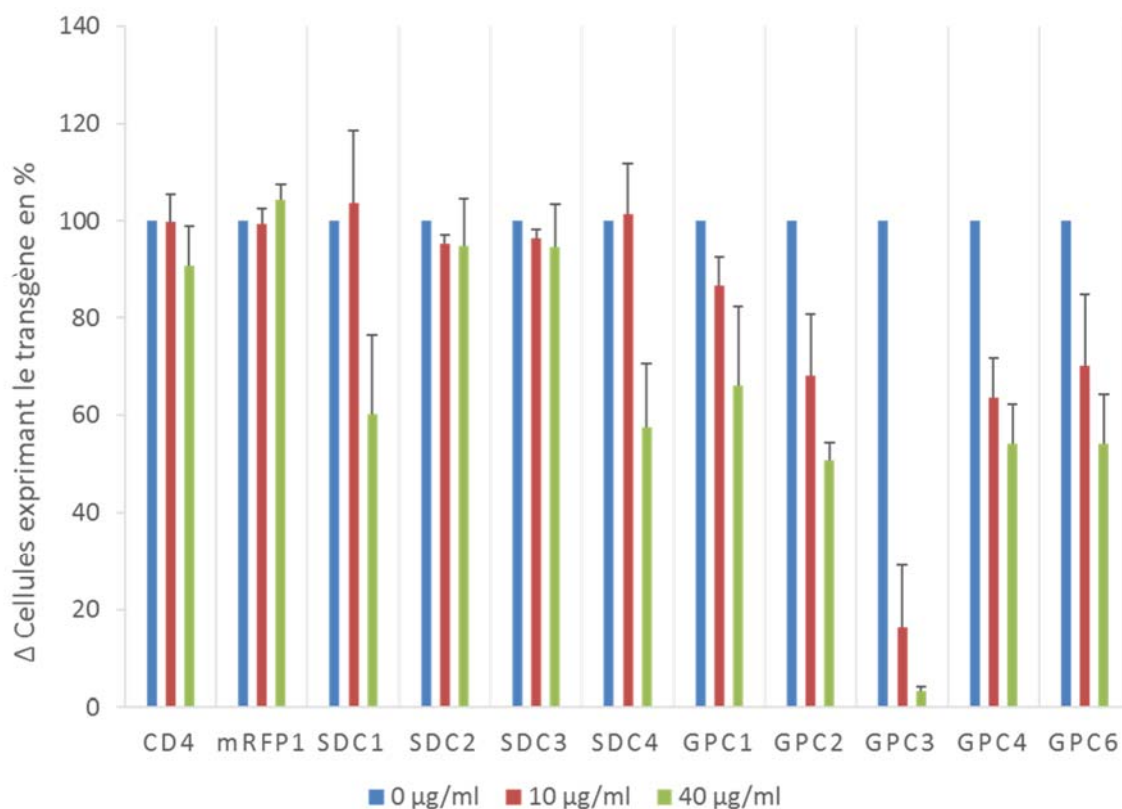


Figure 70 : Domaines extracellulaires des HSPG et efficacité du transfert de gène.

## Dissociation des Polyplexes

La dissociation des polyplexes est un mécanisme additionnel par lequel les ectodomaines des HSPG pourraient interférer avec le processus de transfert de gène (page 55). Dans cette optique, la capacité des ectodomaines (produits dans les cellules CHO-3E7) à induire la dissociation des polyplexes a été évaluée. Pour ce faire, certains glypicanes et syndécanes ont été sélectionnés : les ectodomaines GPC3 et GPC6 ont été choisis en raison de leur forte affinité pour les polyplexes et effet inhibiteur sur l'expression du transgène, l'ectodomaine GPC1 fait également partie de la sélection en raison de sa faible affinité mais aussi sa capacité à inhiber le transfert

de gène, enfin les ectodomaines SDC1 et SDC2 ont été choisis pour leur capacité à lier les polyplexes malgré une faible affinité d'interaction et parce que nous avons mis en évidence leur rôle opposé vis-à-vis du transfert de gène dans les cellules HEK293 [308]. Les polyplexes ont été formés dans les conditions suffisantes à la condensation de l'ADNp c'est-à-dire à un ratio LPEI : ADN égal à 0,5 et une complexation d'une durée de 15 minutes. Chaque ectodomaine a été ensuite ajouté dans le milieu de complexation à des concentrations croissantes et incubés pendant 30 minutes. L'ADN non condensé peut être quantifié grâce à l'agent fluorescent intercalant Picogreen® comme décrit dans la section « méthodes expérimentales » (figure 71). De manière générale, on observe une faible quantité d'ADN décondensé suite à l'ajout des ectodomaines ( $\leq 7,7$  % de la quantité totale d'ADN utilisée pour la formation des polyplexes). L'ajout de la protéine mRFP1 et de l'ectodomaine CD4 dans le milieu de complexation sert de référence et indique quels résultats peuvent être considérés comme significatifs. La dissociation des polyplexes par les différents ectodomaines est proportionnelle à la concentration de ces derniers dans le milieu de complexation. Parmi les ectodomaines étudiés, celui de GPC3 induit la plus forte dissociation des polyplexes avec 7,7 % d'ADN libéré. Néanmoins, ces résultats dévoilent que la dissociation des polyplexes par les ectodomaines est relativement faible et ne serait probablement pas la cause de la diminution de l'internalisation des polyplexes et / ou expression du transgène observée (s) précédemment.

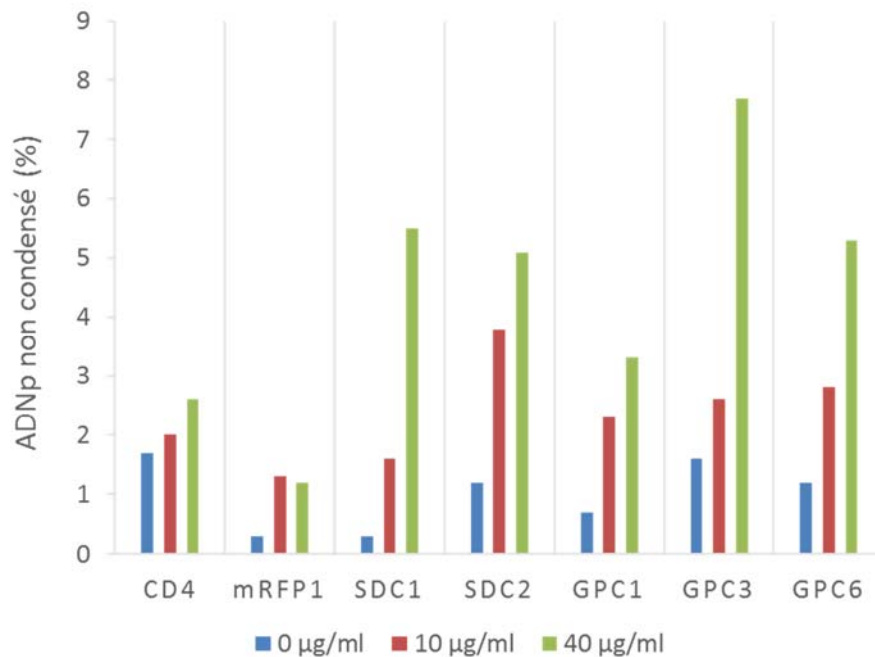


Figure 71 : Dissociation des polyplexes et évaluation de la quantité d'ADNp libérée.

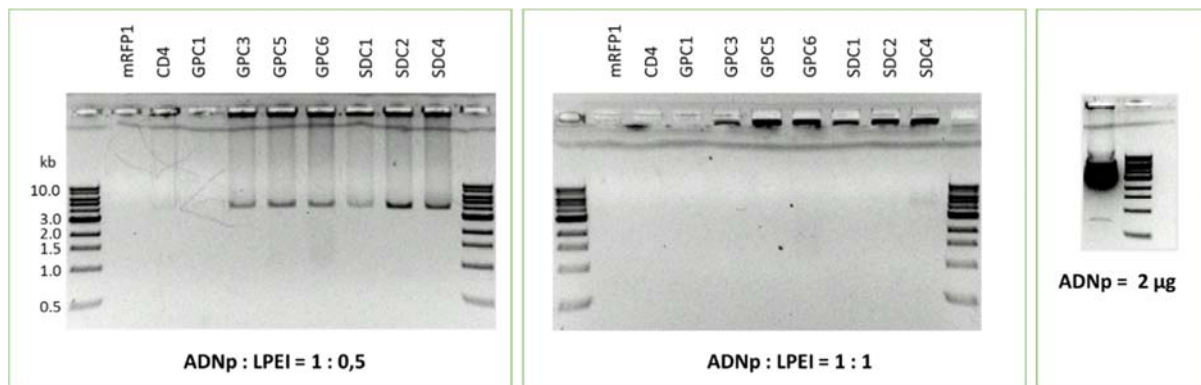


Figure 72 : Intégrité des polyplexes en présence des ectodomaines.

L'ADN libre est capable de migrer dans le gel d'agarose vers la cathode contrairement à l'ADN condensée par le PEI. Lorsque la quantité minimale de PEI permettant la condensation de 2 µg d'ADN est utilisée (ratio 1 : 0,5), on observe une faible dissociation des polyplexes visible par la présence d'ADN libre migrant dans le gel d'agarose. En présence d'un excès de PEI (ratio 1:1), aucune dissociation n'est perceptible dans cette expérience.



Afin d'évaluer la véracité de la méthode de quantification au Picogreen®, la dissociation des polyplexes en présence des ectodomaines peut aussi être appréciée qualitativement grâce à la technique de retard sur gel d'agarose (figure 72). Un volume de 10  $\mu$ L de milieu de complexation en présence de 40  $\mu$ g/mL d'ectodomaines a été chargé sur un gel d'agarose 1% et contenant du bromure d'éthidium. Les polyplexes ne sont pas capables de migrer dans le gel de par leur taille, ou bien le font dans le sens opposé à la migration de l'ADN libre en raison de leur charge globale positive. De manière similaire, les résultats indiquent que la quantité d'ADN libéré en présence des ectodomaines est faible, et ceci en comparaison à la quantité totale d'ADN utilisée pour former les polyplexes (1  $\mu$ g / mL de culture). En présence de mRFP1, de l'ectodomaine CD4 et GPC1, aucun ADN libre n'est observé indiquant une absence de dissociation des polyplexes. Ceci corrobore nos résultats antérieurs où la dissociation des polyplexes en présence d'ectodomaines GPC1 était non significative en comparaison au contrôle mRFP1 et ectodomaine CD4. De plus, on observe que de manière générale la quantité d'ADN libéré par les différents ectodomaines sélectionnés est faible.

## **Expression Stable des Protéoglycanes à Héparane Sulfate**

Le transfert d'un gène d'intérêt peut être qualifié de transitoire, c'est à dire que le gène n'est pas intégré au génome de la cellule hôte. La cellule exprime ainsi le gène d'intérêt durant une période définie dans le temps, habituellement quelques jours, après laquelle le gène est perdu au cours de la division cellulaire et autres facteurs. Le transfert d'un gène d'intérêt de manière stable commence par une transfection transitoire des cellules suivi de l'intégration aléatoire et exceptionnelle du gène étranger. Celui-ci devient partie intégrante du génome de la cellule et peut ainsi être répliqué au cours de la division cellulaire. Dans la plupart des cas, le recours à une transfection transitoire pour l'étude de l'expression d'un gène d'intérêt est suffisante et avantageuse car elle permet d'éviter le travail ardu relié au développement d'une lignée cellulaire stable. Cependant, dans le but d'évaluer l'impact de l'expression de chaque HSPG membranaire sur la transfection des cellules CHO au LPEI, nous avons observé que l'expression transitoire des HSPG n'est pas une méthode appropriée puisqu'elle inhibe la transfection subséquente. En conséquence, nous avons généré des « pools » cellulaires stables en utilisant les cellules CHO<sup>BRI</sup>-55E1 compatibles avec le commutateur cumate. Ce système d'expression

a été développé au CNRC et permet la sélection rapide (2 à 3 semaines) d'un « pool » de cellules exprimant de manière stable le transgène d'intérêt et l'induction de son expression suite à l'ajout de cumate dans le milieu de culture. Les cellules CHO<sup>BRI</sup>-55E1 ont été transfectées avec les différentes constructions plasmidiques développées à cet effet (Annexe 5), puis sélectionnées pour leur habileté à exprimer le transgène de manière stable. Ces deux étapes sont détaillées dans la section « méthodes expérimentales » (page 159). De plus, puisque l'expression stable des HSPG requiert un changement de système d'expression, nous nous sommes assuré dans un premier temps que les cellules CHO<sup>BRI</sup>-55E1 se comportent de manière similaire aux cellules CHO-3E7 (utilisées dans la première partie de cette étude) vis-à-vis du transfert de gène. Nous avons donc effectué une cinétique d'attachement, d'internalisation des polyplexes et d'expression du transgène (BFP) dans les cellules CHO<sup>BRI</sup>-55E1 (figure 73) et comparée cette dernière à celle des cellules CHO-3E7 (voir le chapitre 2).

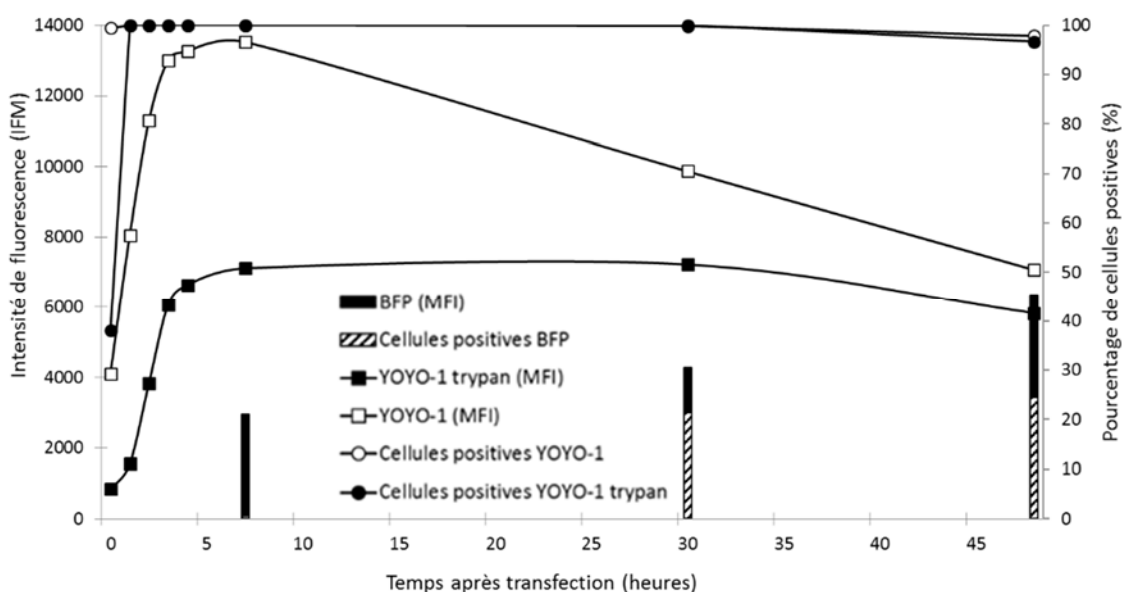


Figure 73 : Cinétique d'attachement et d'internalisation des polyplexes, et expression du transgène dans les cellules CHO<sup>BRI</sup>-55E1.

La comparaison des deux études cinétiques indique que le système d'expression CHO<sup>BRI</sup>-55E1 se comporte de manière analogue au système d'expression utilisé précédemment. Brièvement, 10 minutes après la transfection, on observe que presque la totalité des cellules ont liées des polyplexes alors que leur internalisation s'effectue après environ 1 heure. Par la suite, on observe une augmentation de la fluorescence moyenne de YOYO-1 indiquant que les polyplexes s'accumulent dans les cellules jusqu'à 7 heures après la transfection. L'efficacité de transfection résultante (niveau d'expression de la protéine fluorescence BFP et pourcentage de cellules positives) est inférieure à ce qui a été observé avec le système d'expression en cellule CHO-3E7. Cependant, de manière globale, les cinétiques d'attachement et d'internalisation des polyplexes sont similaires dans les deux lignées cellulaires. On est donc confiant que le changement de système d'expression ne devrait pas influencer l'étude.

Le système utilisé présente l'avantage d'être inductible (commutateur cumate). Nous avons dans un premier temps évalué l'effet du cumate sur l'expression des HSPG (figure 74A et 74B). Les résultats indiquent que l'intensité de fluorescence moyenne (HSPG-mRFP1) augmente en fonction de la concentration finale de cumate dans le milieu de culture. Cette augmentation est plus au moins timide comme c'est le cas pour l'induction du SDC2. D'autre part, le pourcentage de cellules exprimant le transgène n'augmente pas de manière significative après induction, excepté dans le cas du SDC2. Notons que le cumate n'a pas d'effet cytotoxique (détermination de la viabilité cellulaire à l'aide du compteur automatique CEDEX) aux concentrations utilisées hormis dans le cas du SDC1 où une concentration finale de 0,5 µg / mL de cumate aboutit à une diminution de la viabilité. Dans le but d'uniformiser le niveau d'expression de chaque « pool », nous avons déterminé la concentration finale de cumate adéquate (figure 74C). De plus, la capacité des cellules à se diviser plus ou moins rapidement peut influencer l'efficacité du transfert de gène. Nous avons donc entrepris une expérience visant à déterminer les caractéristiques de croissance et de viabilité de chaque pool cellulaire en mode induit en comparaison à la lignée parentale CHO<sup>BRI</sup>-55E1 (figures 75A et 75B) et déterminé le temps de doublement de chaque « pools » cellulaires (figure 75C). Les résultats indiquent que le temps de doublement est comparable d'un « pool » cellulaire à l'autre, ainsi qu'à celui des cellules parentales, et est compris entre 13 et 15 heures.

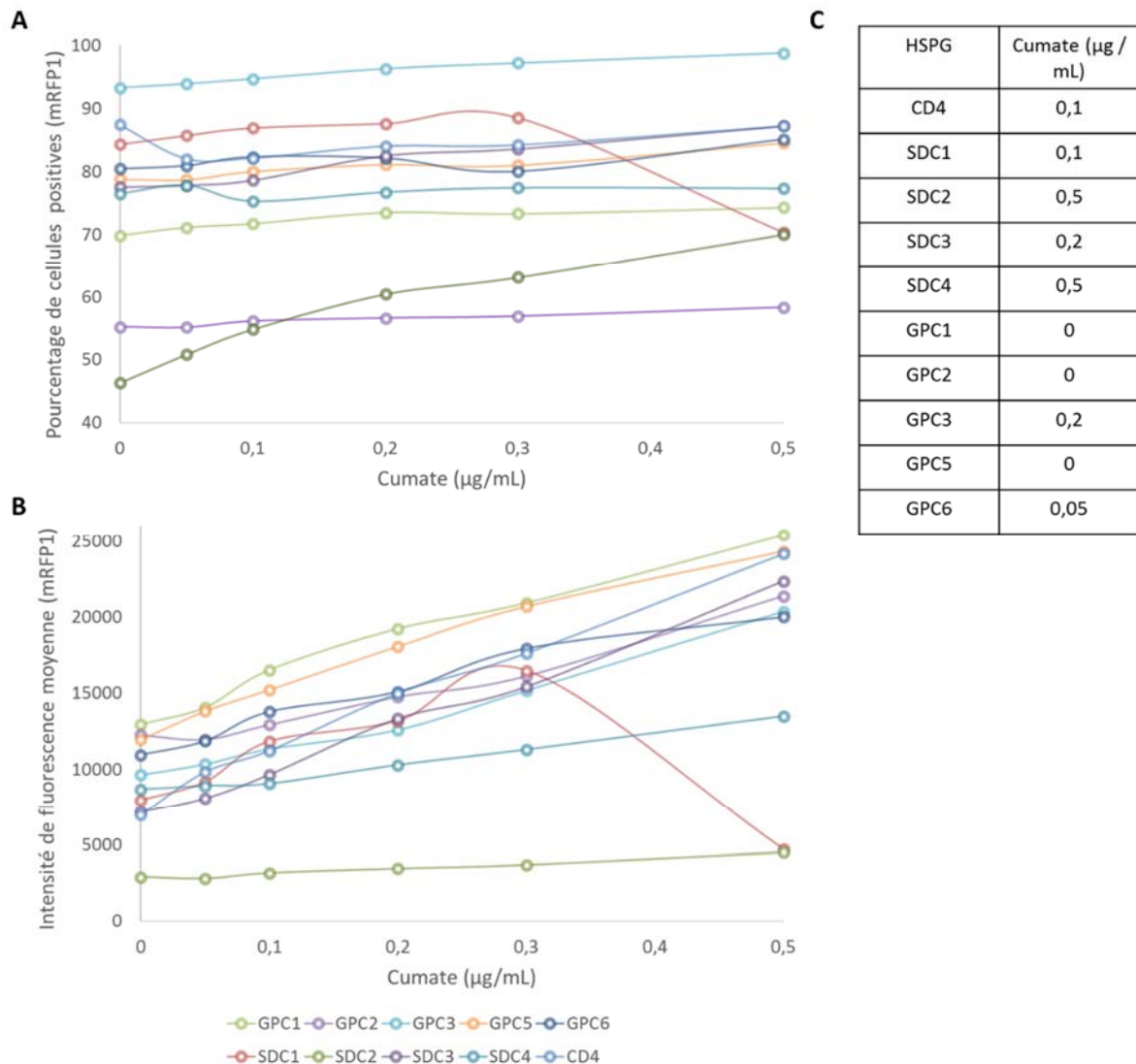


Figure 74 : Effet de l'induction au cumate sur l'expression des HSPG-mRFP1.

L'effet de l'induction sur le niveau d'expression des HSPG (A) et le pourcentage de cellules exprimant les HSPG (B) a été évalué. On remarque que dans certains « pools » et malgré la pression de sélection (MSX), une proportion de cellules n'exprime pas le transgène. Il est en effet possible que certaines cellules aient intégré le gène de résistance mais pas le transgène d'intérêt. La présence de cellules négatives n'est pas un obstacle et nous permet (comme dans les expériences précédentes) de comparer la capacité des cellules exprimant un HSPG en particulier à être transfectées par le LPEI versus les cellules n'exprimant pas d'HSPG. La

concentration finale de cumate (C) a été déterminée afin d'obtenir un niveau d'expression comparable entre chaque « pool » cellulaire.

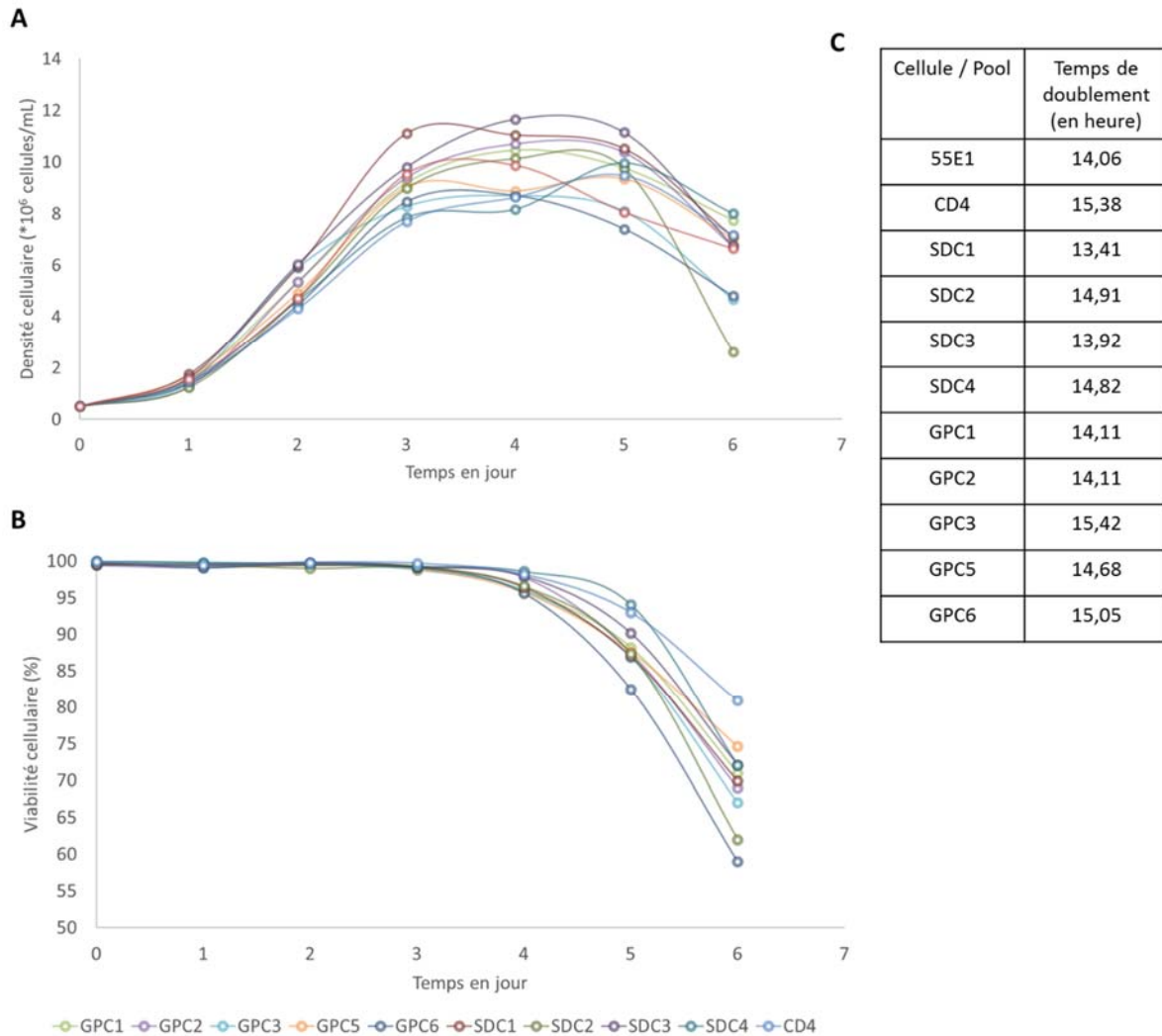


Figure 75 : Croissance et de viabilité des cellules suite à l'induction de l'expression des protéoglycanes à héparane sulfate.

Densité (A) et viabilité (B) des différents « pools » cellulaires. Le temps de doublement (C) a été calculé d'après les quatre premières valeurs de densité cellulaire (jour 0 à 3).

## **Effet de l'Expression Stable des Protéoglycanes à Héparane Sulfate sur la Capture de Polyplexes et l'Efficacité du Transfert de Gène**

Chaque « pool » cellulaire a été transfecté avec le polyéthylèneimine linéaire et la capture des polyplexes ainsi que l'efficacité du transfert de gène ont été déterminées par cytométrie en flux. Dans la première partie de ce chapitre, nous avons observé des différences significatives au niveau de la capture des polyplexes sans pouvoir conclure quant à leur impact sur l'efficacité du transfert de gène. L'expression stable des HSPG devrait possiblement nous permettre de compléter notre étude. De manière surprenante, les résultats indiquent que la présence d'un HSPG spécifique n'influence pas la capture des polyplexes (figure 76 et Annexe 7) par rapport au contrôle (cellules exprimant le transgène CD4-mRFP1). En effet, l'intensité moyenne de fluorescence (YOYO-1) correspond à la quantité de polyplexes internalisés dans les cellules et cette dernière n'est pas influencée de manière significative. On remarque que le pourcentage de cellule ayant intégré les polyplexes est de manière systématique supérieur à 95 % dans des conditions optimales de transfection. Notons que le ratio ADN : PEI a été optimisé pour chaque « pool » cellulaire et les conditions optimales correspondent à un ratio ADN : PEI égal à 1 : 4.

Il n'est donc pas surprenant d'observer que l'efficacité de transfection résultante est similaire malgré la surexpression d'un HSPG spécifique (figure 77 et Annexe 8). Cette observation corrobore les résultats obtenus concernant la capture des polyplexes et soulève quelques questions : (i) les HSPG ont-ils un rôle individuel dans le processus du transfert de gène ? (ii) comment se fait-il que nous avons observé des différences au niveau de la capture des polyplexes dans les cellules CHO-3E7 ? Après avoir effectué un immunomarquage (voir la section « méthodes expérimentales » du chapitre 4 page 117) de chaque « pool » cellulaire en utilisant un anticorps spécifique des héparanes sulfates (anti-HS 10E4), nous avons pu constater que malgré l'augmentation de l'intensité de fluorescence mRFP1 (analyse de cytométrie en flux) suggérant une surexpression des HSPG à la surface des cellules CHO<sup>BRI</sup>-55E1, aucune augmentation de la sulfation n'a été détectée (figure 78).

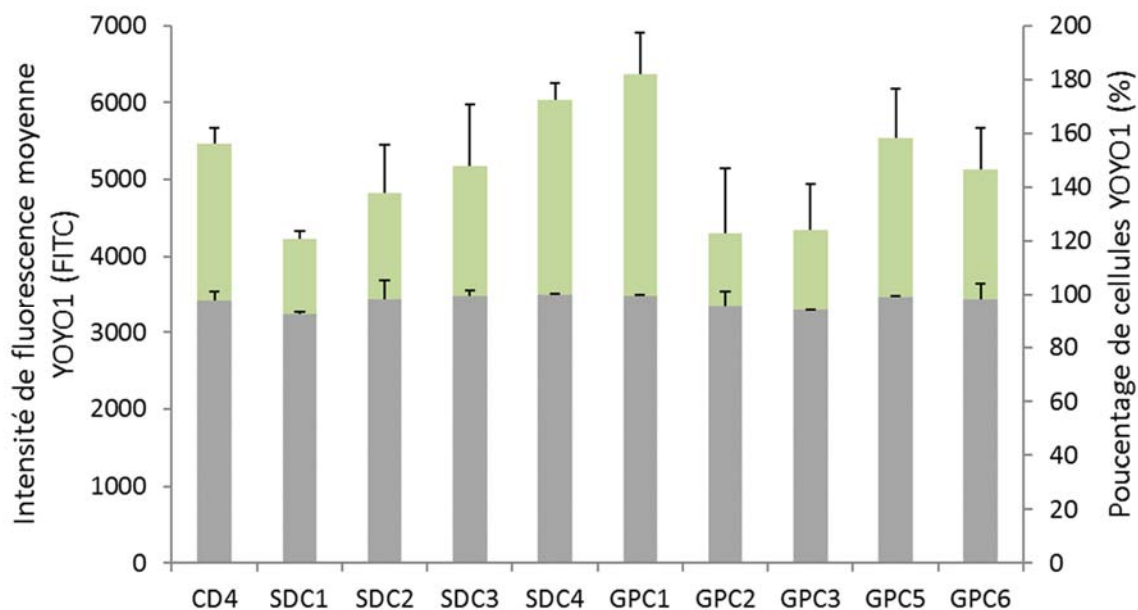


Figure 76 : Effet de l'expression stable des protéoglycanes à héparane sulfate sur la capture des polyplexes par les cellules CHO<sup>BRI</sup>-55E1.

Chaque « pool » cellulaire a été transfecté avec différent ratio ADN : PEI (voir analyse complète à l'Annexe 7). Un total de deux expériences individuelles (en triplicata) a été réalisé et les résultats ci-dessus sont représentatifs de ces deux expériences. Le pourcentage de cellules ayant internalisées les polyplexes et l'intensité de fluorescence moyenne (YOYO-1) correspondant à la quantité de polyplexes internalisés dans les cellules ont été mesurés par cytométrie en flux 24 heures après la transfection.

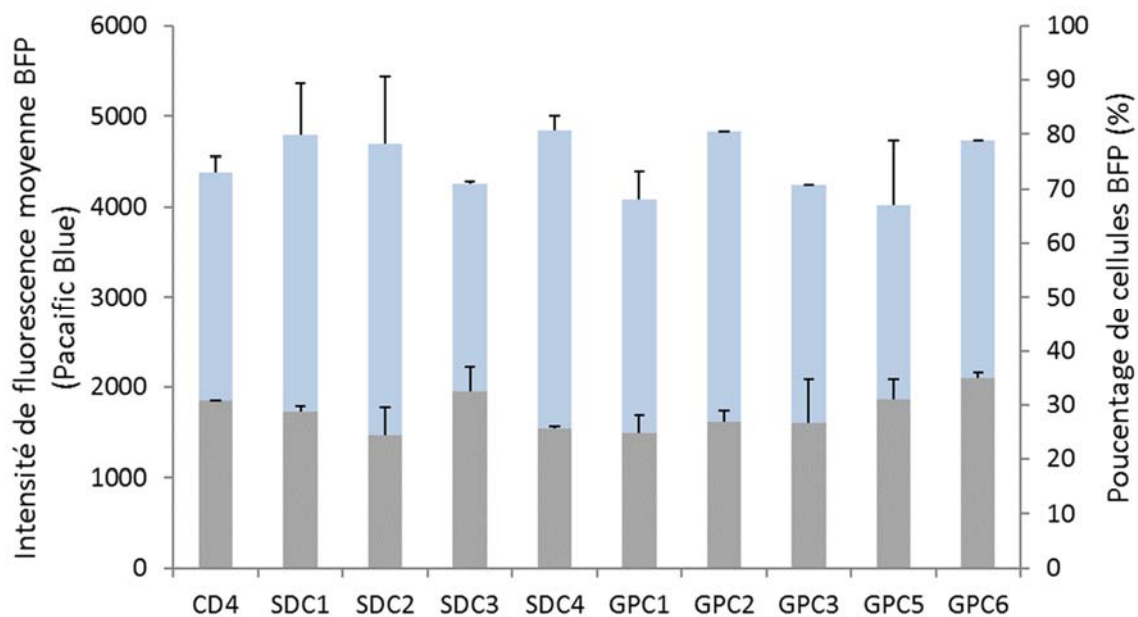
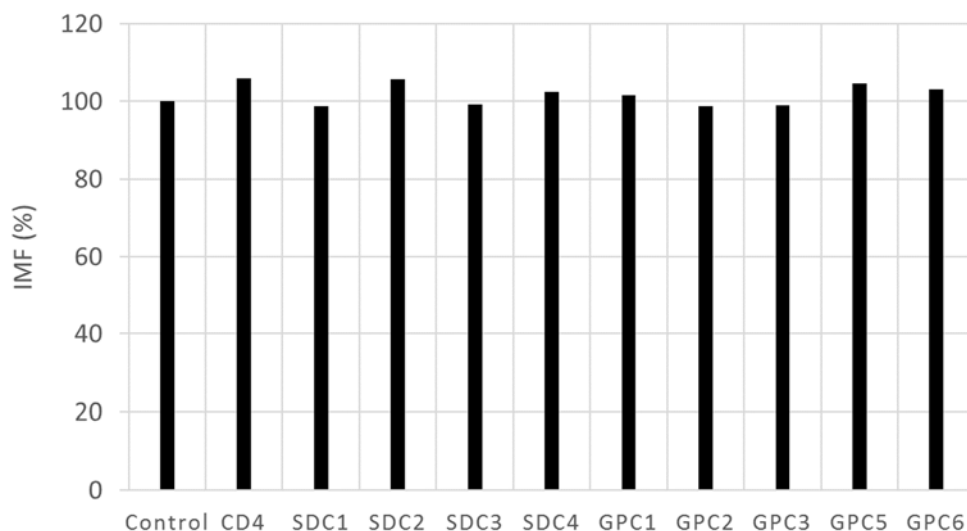


Figure 77 : Effet de l'expression stable des protéoglycanes à héparane sulfate sur l'expression du transgène dans les cellules CHO<sup>BRI</sup>-55E1.

Chaque « pool » cellulaire a été transfecté avec différent ratio ADN : PEI (voir analyse complète à l'Annexe 8). Un total de deux expériences individuelles (en triplicata) a été réalisé et les résultats ci-dessus sont représentatifs de ces deux expériences. Le pourcentage de cellules exprimant le transgène de la BFP et le niveau d'expression du transgène ont été mesurés par cytométrie en flux 48 heures après la transfection.





*Figure 78 : Immunomarquage des différents « pools » cellulaires par l'anticorps anti-HS (clone 10E4).*

## Étude génomique des cellules CHO<sup>BRI</sup>

Le génome est la liste complète des informations génétiques d'un organisme et contient ainsi toutes les séquences codantes (ADN → ARNm → protéine) et non codantes tel une encyclopédie chromosomique. Les données du génome des cellules CHO-K1 et du hamster chinois, ainsi que leurs annotations sont disponibles depuis 2014 sur le site *CHOGenome.org* [405], bien que ces recherches génétiques aient en réalité commencé en 2011 [47]. Depuis ces quatre dernières années on assiste à une explosion des données génomiques de diverses lignées cellulaires CHO utilisées pour la production industrielle de r-protéines humaines (par exemple les cellules CHO-K1, CHO-DG44, CHO-DXB11 [406], CHO-S) [48]. Récemment, le génome des cellules CHO<sup>BRI</sup> a été séquencé au CNRC. Cet outil, nouvellement disponible, nous permet d'investiguer si les gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des HSPG sont présents dans le modèle cellulaire utilisé, et ainsi tenté d'expliquer les résultats obtenus précédemment.

La voie de biosynthèse des HSPG (SDC1-4, GPC1-6) requiert l'intervention d'un certain nombre d'enzymes permettant l'élongation et la modification des chaînes d'héparane sulfate

(page 41). Nous avons donc procédé à une analyse des données génomiques des cellules CHO<sup>BRI</sup> en comparaison à celles des cellules CHO-K1 et du hamster chinois. Les résultats de l'analyse des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des HSPG sont présentés dans le Tableau 6. Nous pouvons observer que la totalité des enzymes essentielles la biosynthèse des HSPG sont présentes dans le génome des cellules CHO-K1 et CHO<sup>BRI</sup>. Toutefois, la présence de ces gènes ne signifie pas pour autant qu'ils soient exprimés dans les cellules. Le Dr. Xu et ses collaborateurs [47] présentent en 2011 une ébauche de l'analyse génomique des cellules CHO-K1 révélant que parmi les gènes impliqués dans les voies de glycosylation seulement 53 % sont exprimés. Nous avons donc compilé les données disponibles du transcriptome des cellules CHO-K1 (littérature) et CHO<sup>BRI</sup> (CNRC) dans le but de déterminer si les gènes impliqués dans la biosynthèse des HSPG sont bien exprimés (Tableau 6). Le gène de l'enzyme 3-O-sulfotransférase (3-OST) semble être silencieux, c'est-à-dire non exprimé dans les cellules CHO-K1. Il s'agit d'une enzyme engagée dans la modification des chaînes d'héparanes sulfates et qui catalyse le transfert d'un sulfate en position du carbone C3 d'un résidu de glucosamine N-sulfaté. Cette enzyme agit préférentiellement dans les régions fortement sulfatées (domaine NS) et permet de générer un motif de liaison spécifique à l'antithrombine III (anticoagulant) [407]. Dans le cas des cellules CHO<sup>BRI</sup>, il semble que l'expression des gènes 3-OST et Hsepi (glucose C5 épimérase permettant la conversion des résidus d'acides glucuroniques en acides iduroniques) ne soient pas exprimés. Ceci indique que la voie de biosynthèse des HSPG est fortement altérée dans les cellules CHO<sup>BRI</sup>. Bien que les mécanismes de régulation de la voie de biosynthèse des HS ne sont pas encore compris, il a été montré que la surexpression de l'enzyme 3-OST résulte en une augmentation de la 2-O, 6-O et même N-sulfations [407] mettant en évidence une interaction concertée des différentes enzymes de la biosynthèse des HS. De plus, l'épimérisation est une étape de modification essentielle des chaînes de HS permettant la formation des domaines NS.

Ces observations indiquent que les cellules CHO<sup>BRI</sup> arborent possiblement des chaînes de HS peu modifiées, ce qui pourrait expliquer les résultats obtenus suite à l'expression stable des HSPG sur le transfert de gène.

Tableau 6 : Analyse des données du génome et du transcriptome des cellules CHO-K1 et CHO<sup>BRI</sup>.

Gene	Nom commun	Fonction	Hamster chinois	CHO-K1 Génome	CHO-K1 Transcriptome	CHO <sup>BRI</sup> Génome	CHO <sup>BRI</sup> Transcriptome
glypicane 1	GPC1	HSPG					
glypicane 2	GPC2	HSPG					
glypicane 3	GPC3	HSPG					
glypicane 4	GPC4	HSPG					
glypicane 5	GPC5	HSPG					
glypicane 6	GPC6	HSPG					
syndécane 1	SDC1	HSPG					
syndécane 2	SDC2	HSPG					
syndécane 3	SDC3	HSPG					
syndécane 4	SDC4	HSPG					
α-4 GlcNac Transférase	EXTL3	Élongation HS	2 variants	3 variants			
exostosin glycosyltransférase 1	EXT1	Élongation HS	1 variant	1 variant			
exostosin glycosyltransférase 2	EXT2	Élongation HS	3 variants	2 variants			
GlcNac N-deacetylase N-sulfotransférase	NTDS	Modification HS	2 variants	2 variants			
GlcC5 épimérase	Hsepi	Modification HS	4 variants	4 variants			
2-O-sulfotransférase	2-OST	Modification HS	1 variant	2 variants			
3-O-sulfotransférase	3-OST	Modification HS	4 variants	6 variants			
6-O-sulfotransférase	6-OST	Modification HS	3 variants	3 variants			

Les sources consultées sont les suivantes : CHOGenome.org pour l'analyse du génome des cellules CHO-K1 et du hamster chinois, Xu et al. [47] pour l'analyse du transcriptome des cellules CHO-K1 et les résultats du groupe de André Nantel au CNRC pour l'analyse du génome et transcriptome des cellules CHO<sup>BRI</sup>. La couleur verte indique la présence et / ou l'expression du gène, alors que la couleur mauve indique une absence du gène ou de son expression. La couleur grise signifie que ces informations ne sont pas encore disponibles et / ou publiées.

## Discussion - Conclusion

Le transfert de gène dans les cellules de mammifères est un mécanisme composé de plusieurs étapes en raison de l'organisation compartimentée de ces dernières. L'entrée de l'ADN plasmidique dans les cellules est une étape cruciale et influencée par la présence des protéoglycanes à héparane sulfate qui décorent la surface de la cellule. L'interaction entre les HSPG et les complexes ADN / polymères cationiques facilite leur endocytose et influence possiblement leur trafic intracellulaire [300]. Malgré l'accumulation des connaissances dans le

domaine [353], le rôle des HSPG dans le processus du transfert de gène est encore mal compris. Nous pouvons évoquer plusieurs raisons à cela. Premièrement, les protéoglycanes à héparane sulfate sont de manière presque systématique étudiés dans leur globalité pour un type cellulaire particulier utilisé comme modèle. Toutefois, chaque type cellulaire possède un profil d'expression en HSPG qui lui est propre empêchant l'extrapolation des observations à un autre type cellulaire. Ensuite, différents membres ayant des caractéristiques structurales uniques composent la grande famille des protéoglycanes à héparane sulfate. Décortiquer minutieusement l'influence de chacun de ces membres représente une approche novatrice dans le domaine, qui permettra de mieux comprendre le mécanisme du transfert de gène, et pourquoi certaines cellules sont plus permissives au transfert de gène que d'autres.

Les résultats de la première approche qui consistait en la surexpression transitoire de chaque HSPG dans les cellules CHO-3E7 indiquent que l'internalisation des polyplexes dans les cellules est augmentée significativement en présence de SDC1, SDC2, SDC3, et GPC2, GPC5, GPC6. Par opposition, la présence de GPC1, GPC3 et SDC4 à la surface des cellules diminue l'internalisation des polyplexes. Ces observations démontrent dans un premier temps que chaque HSPG a des propriétés fonctionnelles spécifiques quant à l'internalisation des polyplexes ou permet dans certains cas le recrutement efficace d'un récepteur activant le mécanisme d'endocytose. Ainsi, dépendamment de son profil d'expression en HSPG, une cellule serait plus ou moins capable d'internaliser les polyplexes efficacement. Néanmoins, l'internalisation des polyplexes n'est pas la seule étape limitante du transfert de gène. En effet, les polyplexes peuvent emprunter plusieurs voies intracellulaires qui aboutissent ou non au passage de l'ADN plasmidique dans le noyau cellulaire [156]. La capacité de chaque protéoglycane à héparane sulfate à guider les polyplexes dans une voie intracellulaire efficace (délivrance de l'ADNp au noyau) n'a pas pu être observée en utilisant cette approche expérimentale. En effet et ce malgré nos efforts, la surexpression transitoire des HSPG à la surface de la cellule par diverses méthodes ne permet pas d'obtenir une bonne efficacité au niveau de la transfection subséquente. Il nous a donc été impossible de conclure sur l'impact de chaque protéoglycane à héparane sulfate quant à l'expression du transgène. De manière intéressante, nous avons remarqué que malgré la faible efficacité de transfection obtenue (moins de 5 %), les polyplexes sont tout de même internalisés dans la majorité voire la totalité des

cellules de la culture (> 95 %). Il est possible que l'expression transitoire des HSPG induise une phase de latence au niveau de la croissance des cellules CHO-3E7, ou encore conduit à la mise en place d'un mécanisme de défense cellulaire prévenant une transfection subséquente [118,202,404].

Les protéoglycanes à héparane sulfate sont des polysaccharides linéaires qui forment le composant principal de la matrice extracellulaire. On les trouve le plus souvent associés à la membrane plasmique bien qu'un clivage protéolytique de leurs domaines extracellulaires (ectodomaines) soit observé dans certains cas. Il est possible que la présence des ectodomaines dans le milieu de culture ait un effet sur le transfert de gène. Nous avons donc étudié l'inhibition compétitive de l'internalisation des polyplexes en présence des ectodomaines. Il apparaît que les polyplexes à base de polyéthylènimine linéaire ont une affinité plus grande envers certains HSPG inhibant de manière drastique l'attachement des polyplexes aux HSPG présents naturellement à la surface des cellules. GPC2, GPC3, GPC5 et GPC6 exhibent la plus forte affinité envers les polyplexes. D'un point de vue structurel, les glypicanes associés au feuillet externe de la membrane plasmique sont liés par une ancre GPI (absence de domaines cytoplasmiques). Leur protéine centrale possède des résidus de cystéines très conservés d'un membre à l'autre formant des ponts disulfures intramoléculaires [241] et ainsi une tête globulaire associée à des chaînes polysaccharidiques de type héparanes sulfates uniquement. L'interaction de forte affinité entre les polyplexes et les GPC2, GPC3, GPC5 et GPC6 n'aboutit pas nécessairement à leur internalisation dans la cellule. En effet, alors que les GPC2, GPC5 et GPC6 favorisent l'endocytose des polyplexes, nous avons montré que le GPC3 l'inhibe de manière considérable.

Afin que l'endocytose des polyplexes soit efficace, il est nécessaire que ces derniers restent intacts (pas de dissociation) une fois en contact avec les différents HSPG. Nous avons donc déterminé la capacité des protéoglycanes à héparane sulfate à induire la dissociation des polyplexes. La faible quantité d'ADN libéré suite à l'ajout d'ectodomaines dans le milieu de complexation indique que la dissociation des polyplexes par les HSPG dans les conditions standards de transfection (excès de PEI) est de manière générale peu probable. Il est également possible que les conditions expérimentales utilisées ne miment pas correctement

l'environnement cellulaire lors de la transfection. Néanmoins, on peut remarquer que la dissociation des polyplexes par le GPC3 est la plus accrue, ce qui est en corrélation avec les résultats observés précédemment. De manière similaire, MacLendon et ses collaborateurs [316] démontrent que parmi les différents glycosaminoglycannes sulfatés, les héparanes sulfates ne sont pas capables d'induire la dissociation des polyplexes alors que celle-ci est stimulée en présence d'héparine (polysaccharide hyper sulfaté équivalent en une succession de domaines NS). Cette étude révèle cependant que l'interaction avec les protéoglycannes à héparane sulfate provoque une déstabilisation des polyplexes (sans dissociation) qui pourrait influencer le transfert de gène [316].

Jusqu'à présent, nos résultats indiquent que les protéoglycannes à héparane sulfate sont capables de lier les polyplexes avec une affinité propre à chaque membre, et que cette interaction facilite dans certains cas l'endocytose. Toutefois, l'endocytose des polyplexes ne garantit pas nécessairement leur cheminement efficace jusqu'au noyau de la cellule. Dans le but d'investiguer le rôle individuel des protéoglycannes à héparane sulfate concernant ce dernier point, nous avons exprimé chaque HSPG de manière stable dans les cellules CHO<sup>BRI</sup>-55E1. Nous avons pu observer que dans ce cas, l'endocytose des polyplexes n'était pas influencée par l'expression spécifique des protéoglycannes à héparane sulfate contrairement à ce que nous avons montré dans les CHO-3E7. De manière analogue, l'expression du transgène n'est pas modifiée en présence de chaque protéoglycane à héparane sulfate. Nous avons constaté avec surprise que la surexpression des protéoglycannes à héparane sulfate dans le modèle cellulaire CHO<sup>BRI</sup> n'aboutit pas à une augmentation de la sulfation totale, bien qu'un accroissement de l'expression de la protéine centrale des HSPG ait été observée (signal mRFP1). On s'interroge donc quant aux raisons de ces différences entre les deux modèles cellulaires CHO. À l'origine, les cellules CHO ont été choisies pour la production de protéines recombinantes car elles sont considérées comme sécuritaires (ne propagent pas la plupart des virus humains), se divisent rapidement, sont faciles à transfecter et l'intégration du transgène y est facilitée [408]. Les cellules CHO ont été utilisées en culture comme système d'expression durant les 50 dernières années. Cependant, l'analyse du génome de plusieurs lignées cellulaires CHO a mis en évidence une hétérogénéité génétique importante provoquée par la génération de populations et sous-populations clonales et des conditions de culture non standardisées d'un laboratoire à l'autre

[409]. Le nom CHO réunit donc une diversité de type cellulaire d'un point de vue génétique. Suite à l'analyse du génome et du transcriptome des cellules CHO<sup>BRI</sup>, nous avons montré que le gène de deux enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse des HSPG pourrait être silencieux (c'est-à-dire non exprimé, bien qu'une confirmation par RT-PCR serait judicieuse). Il s'agit de la GlcC5 épimérase qui permet la conversion des résidus d'acide gluconique en acide iduronique. Ces motifs sont ensuite reconnus par les différentes sulfotransférases qui catalysent les réactions de sulfation (N-, 6O-, 2O- et 3O- sulfations). La 3O-sulfotransférase est une enzyme qui n'est pas exprimée dans les cellules CHO<sup>BRI</sup> et les cellules CHO-K1 (cellule d'origine). Bien que la 3O-sulfation soit un événement rare dans les cellules de mammifères (généralement restreintes aux mastocytes), sa stimulation régulerait à la hausse la 2O, 6O et N-sulfations [407]. De ce fait, les HSPG présents à la surface des cellules CHO<sup>BRI</sup> suite à leur expression stable sont probablement peu modifiés et sulfatés car la cellule ne posséderait pas l'équipement enzymatique nécessaire. L'utilisation des cellules CHO comme modèle d'étude dans le contexte du transfert de gène est un choix rationnel basé sur leur utilisation intensive dans l'industrie pharmaceutique. Cependant, leur diversité génétique est une entrave à la compréhension des mécanismes biologiques mis en place. Il est donc nécessaire de considérer les évidences publiées utilisant les cellules CHO comme modèle avec précaution.

## Chapitre 6 : Conclusion Générale

### Généralités

Les protéines recombinantes (r-protéines) constituent du matériel biologique d'intérêt dans de nombreux domaines qui s'étendent de l'industrie agroalimentaire à l'industrie pharmaceutique, en passant par la recherche en biologie cellulaire et moléculaire. La production de r-protéines est un procédé biotechnologique faisant intervenir un vecteur d'expression (généralement un ADN plasmidique) associé à un vecteur de transfert (vecteur viral ou non-viral) et une cellule hôte chargée de synthétiser la protéine d'intérêt. Du fait de son large champ d'application, la production de r-protéines est sollicitée de manière croissante mettant à l'épreuve les capacités de production des cellules hôtes utilisées. La production rapide de r-protéines à intérêt thérapeutique est un enjeu économique énorme pour l'industrie pharmaceutique. Malgré une transposition industrielle usuelle du procédé, les rendements de production constituent un défi auquel doit faire face l'industrie pharmaceutique. De plus, plusieurs autres applications pourraient bénéficier d'une production plus efficace, diminuant ainsi les coûts du produit final. Ce faisant, plusieurs axes de recherche ont émergé en vue d'optimiser le procédé du transfert de gène : le développement de vecteurs d'expression plus performants, l'optimisation des conditions de culture (milieu, supplémentation, environnement contrôlé), l'optimisation de la qualité du produit (limiter l'agrégation des protéines par exemple), la réduction de la cytotoxicité et de manière plus générale une meilleure maîtrise et compréhension du processus du transfert de gène qui est, quant à elle, une des motivations de ce projet. Actuellement, environ 60 à 70 % des r-protéines d'intérêt thérapeutique sont produites dans les cellules de mammifères qui supportent des motifs de glycosylation complexes. Parmi les nombreux vecteurs du transfert de gène, le polyéthylèneimine offre une solution adaptée pour la production rapide à grande échelle de r-protéines. En effet, en plus de permettre le transfert efficace d'un gène d'intérêt dans les cellules de mammifères, il est simple d'utilisation, stable en solution (avantage par rapport aux vecteurs non-viraux de nature lipidique) et peu coûteux. Le polyéthylèneimine permet la condensation de l'ADNp sous forme de polyplexes qui doivent surmonter de nombreux obstacles afin de mener ultimement à l'expression du transgène. *In vitro*, la membrane plasmique est le premier obstacle que rencontre les polyplexes. Cette dernière est décorée par



un type particulier de glycoprotéines : les protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG) qui sont capables d'interagir avec les polyplexes facilitant possiblement leur endocytose et influençant leur trafic intracellulaire [410]. Les glypicanes et les syndécanes constituent les deux principales familles d'HSPG membranaires et jouent un rôle important au niveau physiologique comme par exemple l'adhésion et la migration cellulaire [225] mais aussi au niveau du développement [265]. Ils représentent également la voie d'entrée de divers pathogènes comme le virus de l'herpès simplex [268,411], le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) [412] ou encore le papillomavirus humain [413]. De nombreuses pathologies découlent de leur dysfonctionnement, sous ou sur-régulation [260,270,271]. Dans le contexte du transfert de gène, le rôle des protéoglycanes à héparane sulfate est étudié dans son ensemble alors que nous émettons l'hypothèse que chaque membre des glypicanes (GPC1-6) et syndécanes (SDC1-4) jouent un rôle distinct. Ainsi, dépendamment de son profil d'expression en HSPG, une cellule serait plus ou moins permissive au transfert de gène. Un des objectifs de ce projet était de participer à l'approfondissement des connaissances concernant les mécanismes et acteurs principaux du transfert de gène dans le but d'améliorer les performances des plateformes de production en cellules CHO et HEK293. L'autre objectif était de préciser le rôle individuel des protéoglycanes à héparane sulfate quant à leur capacité de liaison et d'internalisation des polyplexes, mais également leur permissivité vis-à-vis de l'expression d'un transgène.

## **Le Transfert de Gène dans les Cellules de Mammifères CHO et HEK293**

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la compréhension du processus de transfert de gène dans les cellules de mammifères CHO et HEK293 (chapitre 2). Bien que cette étude ne concerne pas les protéoglycanes à héparane sulfate en tant que tels, elle a permis de mieux comprendre le modèle choisi (*i.e.* système d'expression : CHO et HEK293, vecteur de transfert : polyéthylènimine). De manière générale (*i.e.* en utilisant trois polyéthylénimines linéaires distincts d'un point de vue de leurs caractéristiques physico-chimiques), l'attachement des polyplexes à la surface des cellules CHO et HEK293 est un mécanisme rapide (la majorité des cellules ont attaché des polyplexes 10 minutes après la transfection). L'internalisation des polyplexes par la totalité des cellules de la culture requiert environ 1 heure et une accumulation

des polyplexes est ensuite observée (jusqu'à 7 heures après la transfection dans les cellules HEK293 et 24 heures après la transfection dans les cellules CHO). De manière intéressante, la quantité de polyplexes à base de PEIpro<sup>TM</sup> internalisée dans les cellules CHO et HEK293 correspond à environ la moitié de celle qui est internalisée dans le cas des polyplexes à base de LPEI ou PEI« Max ». Néanmoins, le niveau d'expression du transgène résultant de la transfection avec le PEIpro<sup>TM</sup> est similaire à celui obtenu avec le PEI « Max ». Les PEI « Max » et PEIpro<sup>TM</sup> sont des polyéthylènimines linéaires ayant subi une hydrolyse acide intensive et en conséquence présentent une déacylation supérieure à celle du LPEI. La déacylation du polyéthylènimine est une modification avantageuse car l'utilisation de polyéthylènimines entièrement déacylés (PEI « Max » et PEIpro<sup>TM</sup>) aboutit à un meilleur rendement de production dans les deux types cellulaires. Toutefois, le degré de déacylation explique en partie seulement l'efficacité du PEIpro<sup>TM</sup> (quantité nécessaire pour 1 µg d'ADNp et expression du transgène efficace malgré une internalisation des polyplexes inférieure à celle observée avec les autres polyéthylènimines). En effet, le PEIpro<sup>TM</sup> est moins déacylé que le PEI« Max » mais plus monodisperse et arbore un plus haut poids moléculaire. Ceci pourrait expliquer les différences observées au niveau des cinétiques d'attachement et d'internalisation des polyplexes. Beaucoup d'autres observations ont été faites dans le cadre de cette étude et nous ont permis de mieux comprendre la relation structure / activité du vecteur synthétique polyéthylènimine et de mettre en évidence les différences entre les deux systèmes d'expression qui ont été utilisés dans les études subséquentes. De plus, nos résultats constituent une base solide de l'enchaînement dans le temps des événements essentiels à une transfection efficace des cellules CHO et HEK293 par le polyéthylènimine.

## **Rôle des Protéoglycanes à Héparane Sulfate dans le Transfert de Gene des Cellules CHO et HEK293**

L'importance des protéoglycanes à héparane sulfate dans le transfert de gène des cellules CHO et HEK293 (chapitre 4) a été démontré grâce au traitement des cellules par le chlorate de sodium (désulfatation) et l'héparinase III (clivage spécifique des chaînes d'héparanes sulfates). Le traitement chimique des cellules au chlorate de sodium (suppression / diminution de la sulfatation) a permis de mettre en évidence que le profil d'expression des protéoglycanes à

héparane sulfate varie entre les cellules CHO et HEK293. De plus, on a pu remarquer un polymorphisme au niveau des chaînes d'héparanes sulfates dépendamment de leur degré de modification dans les cellules CHO et HEK293. De manière générale, la diminution de la sulfation altère proportionnellement l'efficacité du transfert de gène par le LPEI et BPEI dans les cellules CHO et HEK293, exception faite des cellules CHO transfectées avec le BPEI. Dans ce dernier cas, l'efficacité de transfection est augmentée suggérant un impact négatif des GAG sulfatés (soit par la simple séquestration des polyplexes à la surface de la cellule, soit par la guidance des polyplexes dans une voie intracellulaire n'aboutissant pas à l'entrée de l'ADNp dans le noyau). Il existe plusieurs types de GAG sulfatés et dans le but d'investiguer la contribution des héparanes sulfates, nous avons procédé à des traitements enzymatiques clivant spécifiquement les chaînes d'héparanes sulfates. Les résultats indiquent que les héparanes sulfates ne seraient pas les principaux acteurs de la liaison des polyplexes à base de LPEI et BPEI. Cependant, l'efficacité du traitement est ici remise en question au vu des analyses d'immunomarquage de la surface des cellules qui révèlent une nette diminution de la présence des héparanes sulfates après la transfection. Les protéoglycanes à héparane sulfate serait donc impliqués dans le processus de transfert de gène. Cependant, leur impact bénéfique ou négatif quant à l'efficacité de transfection résultante dépend du type cellulaire et probablement de la relative abondance de certains HSPG à leur surface, mais aussi du type de polyéthylèneimine utilisé (forme linéaire ou branchée) suggérant que l'interaction polyplexes / HSPG est plus spécifique qu'actuellement décrite dans la littérature (interaction non-spécifique de type électrostatique [353]).

Il est important de noter que malgré nos efforts les cellules CHO ne sont pas efficacement transfectables par le BPEI. Cette observation a été consolidée suite à la transfection de deux autres lignées cellulaires CHO : CHO-DG44 (*dhfr<sup>-/-</sup>*) et CHO<sup>BRI</sup> (*dhfr<sup>+/-</sup>*). La cinétique d'attachement et d'internalisation des polyplexes à base de BPEI dans les cellules CHO est significativement ralentie en comparaison de celle observée lors d'une transfection efficace. Lorsque que du LPEI libre est ajouté une heure après la transfection, l'internalisation des polyplexes à base de BPEI est rétabli et se traduit par une meilleure expression du transgène. Ces observations suggèrent que les polyplexes à base de BPEI sont temporairement séquestrés à la surface des cellules CHO (internalisation complète après 4 heures). De manière surprenante,

il existe dans la littérature quelques exemples d'utilisation du BPEI pour la transfection des cellules CHO. Notamment celui de la publication de Ruponen *et al.* [310] démontrant l'impact négatif des protéoglycanes à héparane sulfate sur le transfert de gène, corroborant par la même occasion nos résultats.

## Syndécanes et Glypicanes

Il existe deux familles principales de protéoglycanes à héparane sulfate localisés à la surface des cellules : les syndécanes et les glypicanes qui diffèrent drastiquement dans leur mode d'attachement à la membrane plasmique. Alors que la protéine centrale des syndécanes est transmembranaire, celle des glypicanes est attachée au feuillet externe de la membrane plasmique grâce à une ancre GPI. Les syndécanes (SDC1-4) sont donc des glycoprotéines transmembranaires qui ont la capacité d'agir en tant que (i) récepteurs permettant l'endocytose des ligands [314], ou bien en tant que (ii) corécepteurs menant les ligands à proximité immédiate de leur récepteur [214,283]. Leur domaine extracellulaire porte entre 3 à 5 chaînes d'héparanes sulfates qui interagissent avec de nombreux ligands incluant des facteurs de croissance, des cytokines, l'anticoagulant antithrombine, etc... [250] Les études portant sur la voie d'entrée des systèmes nanoparticulaires indiquent qu'ils ont la capacité d'agir en tant que récepteurs autonomes et de ce fait supporter l'internalisation des nanoparticules [353]. Dans le contexte du transfert de gène, les protéoglycanes à héparane sulfate sont étudiés principalement dans leur globalité [300] ou bien en accordant un intérêt particulier aux syndécanes [353]. Il existe plusieurs raisons à cela : premièrement, du fait de leur domaine cytoplasmique, les syndécanes sont activement impliqués dans l'endocytose de nombreux ligands [314]. Ils sont donc un lien évident de communication entre l'environnement extracellulaire et le compartiment intracellulaire. Deuxièmement, les syndécanes sont impliqués dans le catabolisme de nombreux ligands qui sont essentiels à la cellule tels que les facteurs de croissance, les cytokines, les enzymes et les agents pathogènes [250]. Troisièmement, parmi les quatre membres de la famille des syndécanes, le SDC1 attire beaucoup d'attention en raison d'une forte homologie de séquence d'une espèce à l'autre (par exemple : 50% d'homologie avec le seul syndécanne présent chez la drosophile). Ceci suggère une fonction essentielle du SDC1. De plus, il a été montré que le SDC1 interagit avec les polyplexes facilitant leur endocytose alors que le SDC2 agit comme

molécule accessoire [308]. En effet, les polyplexes se lient au SDC1 et SDC2 mais seul l'interaction avec le SDC1 conduit à l'endocytose efficace des polyplexes (survenant environ 1 heure après la transfection). De manière intéressante, lorsque les SDC1 et SDC2 sont coexprimés, le SDC2 exerce un effet négatif dominant (pas d'internalisation visible même 6 heures après la transfection). Le SDC1 agirait donc comme récepteur autonome des polyplexes et sa surexpression augmente l'efficacité de transfection dans les cellules HEK293 [308] et HeLa [307].

## **Le syndécan-1 et le Cheminement Intracellulaire des Polyplexes**

Pour les diverses raisons que nous venons d'évoquer, nous avons choisi de caractériser la (les) voie (s) d'entrée et le cheminement intracellulaire des complexes SDC1 / polyplexes qui conduit à l'expression efficace du transgène (chapitre 3). Pour ce faire, nous avons utilisé les cellules HEK293 exprimant de manière stable le SDC1 comme modèle. Une fois les polyplexes liés à la membrane plasmique, conséquence de l'interaction avec les protéoglycanes à héparane sulfate, leur progression dans la cellule implique généralement : l'endocytose des polyplexes, l'échappement du compartiment endolysosomal grâce à l'effet « pompe à proton », la libération des polyplexes dans le cytoplasme, l'entrée des polyplexes ou de l'ADNp dans le noyau, et enfin l'expression du transgène. Nos résultats ont mis en évidence que les polyplexes liés au SDC1 sont internalisés par plusieurs voies d'endocytose mais principalement *via* les radeaux lipidiques. La majorité des endosomes contenant les complexes est ensuite adressée au réseau trans-golgien dans lequel on assiste à une dissociation des complexes SDC1 / polyplexes. Le SDC1 est dégradé alors que les polyplexes forment de larges agrégats dans le cytoplasme de la cellule. Il est peu probable que ces agrégats contribuent à l'expression du transgène cependant, nous avons mis en lumière que les polyplexes liés au SDC1 pourraient atteindre le noyau par une voie faisant intervenir le réticulum endoplasmique. Nos observations indiquent que les polyplexes liés au SDC1 empruntent donc deux voies intracellulaires distinctes : une voie endolysosomale (minoritaire) et une voie faisant intervenir le compartiment golgien de la cellule (majoritaire). Laquelle de ces voies est efficace, c'est-à-dire conduit au passage des polyplexes ou de l'ADNp dans le noyau reste une question en suspens. Il aurait été intéressant de suivre le cheminement des polyplexes jusqu'au noyau, or les techniques de marquages et d'analyses

actuelles ne le permettent pas. En effet, la méthodologie utilisée dans cette étude s'appuie essentiellement sur la microscopie confocale permettant d'analyser la colocalisation entre les différents organites de la cellule et les complexes SDC1 / polyplexes. Bien que la microscopie confocale soit une technique précise, rapide et relativement simple, elle est principalement qualitative représentant la limite du cadre expérimental de l'étude. De ce fait, il est important de collecter les données sur un grand nombre d'échantillons pour assurer la conformité des résultats. Conscient de cette limitation, nous avons de manière systématique procédé à une analyse de 10 à 20 cellules pour un minimum de deux expériences individuelles. Une dernière limitation de cette étude consiste en l'utilisation d'une étiquette GFP dans le but de suivre le cheminement du SDC1 dans la cellule. En effet, le cheminement intracellulaire d'une molécule est traditionnellement étudié grâce à l'utilisation d'une étiquette fluorescente (GFP, BFP, RFP, etc.). Cependant, la structure des syndécanes est une limitation majeure à cette approche. Dans notre étude, l'étiquette GFP est positionnée du côté C-terminal (intracellulaire) pouvant affecter les voies de signalisation induites par le domaine cytoplasmique C2 du SDC1 (présence d'un site de liaison aux protéines à motifs PDZ). Il serait intéressant de s'assurer de la fonctionnalité du domaine intracellulaire C2 en présence de l'étiquette GFP. Pour ce faire, nous pourrions comparer l'affinité de quelques protéines à motifs PDZ en présence ou en absence de l'étiquette GFP en utilisant la technique de résonance plasmonique de surface (SPR) par exemple.

De manière importante, notons que de nombreuses évidences révèlent que le SDC1 agit possiblement comme un récepteur « autonome » des polyplexes conduisant à leur endocytose et leur cheminement efficace jusqu'au noyau. Néanmoins, la complexité du contexte moléculaire de la membrane plasmique est tel qu'il est extrêmement difficile, voire impossible, d'adresser le rôle (isolé) du SDC1 et d'exclure l'implication d'autres molécules. Il aurait été possible de réaliser une coimmunoprécipitation des complexes formés afin d'identifier les intervenants potentiels (autre que le SDC1).

## **Les Glypicanes et le Transfert de Gène des Cellules CHO et HEK293**

Quant à eux, les glypicanes sont des glycoprotéines à ancrage GPI et jouent un rôle essentiel dans la signalisation de Wnts, Hedgehogs, facteurs de croissance et protéines morphogéniques osseuses agissant essentiellement comme corécepteurs ou antagonistes [242,395]. Or la

présence de chaînes d'héparanes sulfates suggère qu'ils sont capables d'interférer dans le processus du transfert de gène en interagissant avec les nanoparticules cationiques. Le devenir des nanoparticules cationiques liées aux glypicanes et le rôle de ces derniers dans les étapes du transfert de gène est inexploré représentant un axe de recherche novateur et pertinent.

Grâce à des traitements enzymatiques éliminant spécifiquement les glypicanes de la surface des cellules, nous avons mis en lumière l'effet négatif des glypicanes dans le processus de transfert de gène par le LPEI. Le cas du transfert de gène par le BPEI est un peu plus complexe puisque la présence des glypicanes semble avoir un impact bénéfique pour les cellules CHO à l'inverse des cellules HEK293. La régulation du transfert de gène par les protéoglycanes à héparane sulfate est un mécanisme beaucoup plus complexe que suggéré dans la littérature. De manière intéressante, l'élimination des glypicanes à la surface des cellules augmente l'efficacité de transfection par le LPEI dans les deux types cellulaires étudiés. Ceci représente une stratégie permettant possiblement l'amélioration du processus de transfert de gène par le LPEI et l'augmentation des rendements de production. Cependant, ces résultats (chapitre 4) se basent principalement sur l'effet de plusieurs traitements chimiques et enzymatiques dont l'efficacité peut être mise en doute. C'est pourquoi une évaluation de la spécificité et de l'efficacité des traitements a été proposée de manière systématique. Cette évaluation permet ainsi de nuancer les résultats obtenus. De plus, l'approche « perte de fonction » utilisée est intéressante car elle permet d'investiguer le rôle des glypicanes présents naturellement à la surface des cellules en évitant d'introduire un biais expérimental dû à une approche « gain de fonction » (surexpression). Néanmoins, il est coutumier de proposer une méthode alternative dans le but de consolider les résultats. La technique d'interférence par ARN répondrait à cette limitation. Elle permettrait par exemple de bloquer la traduction des glypicanes ou de l'enzyme GPI transamidase catalysant la réaction d'addition de l'ancrage GPI (dans le réticulum endoplasmique). Faut-il encore s'assurer de la spécificité et l'efficacité de l'interférence. De plus, il serait nécessaire d'introduire les ARNi dans la cellule par transfection ou encore en utilisant des peptides de pénétration cellulaire (CPP) ce qui empêcherait possiblement la transfection subséquente au LPEI et BPEI (chapitre 5). Il serait également possible de générer une lignée cellulaire stable déficiente pour l'enzyme GPI transamidase en espérant que les cellules soient viables.

## **Le Rôle Individuel des Protéoglycanes à Héparane Sulfate dans le Transfert de Gène des Cellules CHO**

Comme nous l'avons mentionné à plusieurs reprises, les protéoglycanes à héparane sulfate sont généralement étudiés dans leur globalité. Toutefois, à la lumière de quelques études publiées et de nos observations, nous émettons l'hypothèse que chaque membre possède un potentiel distinct vis-à-vis du transfert de gène. Ainsi, le but de cette étude est d'évaluer le rôle de chaque protéoglycane à héparane sulfate dans les différentes étapes du transfert de gène et notamment au niveau de l'attachement et l'internalisation des polyplexes à base de polyéthylèneimine, mais aussi de l'expression du transgène. Plusieurs bénéfices sont attendus suite à cette étude : (i) participer à l'accroissement des connaissances dans le domaine du transfert de gène, (ii) augmenter de manière significative les rendements de production des cellules CHO et HEK293 en identifiant un (des) protéoglycane (s) à héparane sulfate capable (s) de guider efficacement les polyplexes, (iii) prédire la spécificité d'un tissu quant au transfert de gène par le polyéthylèneimine dans le contexte de la thérapie génique non virale.

Premièrement, nous avons mis en évidence que la surexpression de chaque protéoglycane à héparane sulfate dans les cellules CHO-3E7 affecte de manière distincte l'internalisation des polyplexes à base de LPEI. Alors que certains protéoglycanes à héparane sulfate agissent comme activateurs de l'endocytose, d'autres ont un rôle inhibiteur. En effet, l'internalisation des polyplexes dans la cellule est augmentée significativement en présence de SDC1, SDC2, SDC3, et GPC2, GPC5, GPC6 à la surface des cellules CHO-3E7. Par opposition, la présence de GPC1, GPC3 et SDC4 à la surface des cellules diminue l'internalisation des polyplexes. De manière intéressante, l'effet activateur n'est pas restreint aux membres d'une même famille. Ainsi l'internalisation des polyplexes est le reflet de la composition en HSPG de la surface d'une cellule plutôt que de leur abondance. De plus, chaque protéoglycane à héparane sulfate exhibe une affinité particulière envers les polyplexes qui a été démontrée par des expériences de compétition faisant intervenir les ectodomains solubles. Une forte affinité pour les polyplexes n'est pas nécessairement de pair avec leur endocytose (citons comme exemple le GPC3 qui exhibe une forte affinité pour les polyplexes mais inhibe leur endocytose). Les ectodomains présents dans le milieu de culture avant la transfection ont donc un effet inhibiteur sur



l'internalisation des polyplexes et par conséquent sur l'expression du transgène. Il est possible que les protéoglycanes à héparane sulfate soient capables d'induire une dissociation des polyplexes par un effet de répulsion de l'ADNp et ou compétitif pour l'interaction avec le PEI. Une dissociation prématurée pourrait affecter l'internalisation du matériel génétique. Or la capacité de dissociation des polyplexes par les HSPG est relativement faible (en comparaison à l'héparine par exemple) avec seulement 7 % de l'ADN total libéré. Ceci suggère que l'intégrité des polyplexes est maintenue suite à leur interaction avec les HSPG et qu'il ne s'agit probablement pas du mécanisme expliquant l'effet inhibiteur de l'endocytose des polyplexes en présence de GPC1, GPC3 et SDC4. Une fois les polyplexes internalisés, ces derniers doivent être dirigés dans une voie intracellulaire permettant la délivrance du matériel génétique dans le noyau de la cellule. Le rôle des protéoglycanes à héparane sulfate quant au routage efficace des polyplexes dans la cellule n'a pu être évalué avec les approches expérimentales utilisées (expression transitoire par transfection, électroporation, transduction, lipofection ou expression stable). En effet, l'expression transitoire de chaque protéoglycane à héparane sulfate à la surface des cellules empêche une transfection subséquente efficace. A l'inverse, l'expression stable permet une transfection ultérieure efficace or le modèle cellulaire choisi s'est avéré être une limite majeure de l'étude.

Le cadre expérimental utilisé représente la principale limitation quant à l'évaluation du rôle des protéoglycanes à héparane sulfate dans le routage efficace des polyplexes jusqu'au noyau. Bien que des propriétés distinctes vis-à-vis de l'internalisation des polyplexes ont été observées pour chaque HSPG, nous ne sommes malheureusement pas parvenus à conclure quant à leur effet sur l'expression du transgène. Les cellules CHO ont été choisies comme modèle en raison de leur popularité pour la production de r-protéines dans l'industrie pharmaceutique mais s'avère être un choix peu judicieux pour une approche « gain de fonction » (surexpression des HSPG). En effet, les cellules CHO-3E7 sont dérivées des cellules CHO-K1 qui, d'après les analyses du transcriptome, n'expriment pas l'enzyme 3O-sulfotransférase qui catalyse les réactions de transfert d'un groupement sulfate sur un résidu de glucosamine. Alors que la 3O-sulfation reste un évènement rare dans la plupart des cellules de mammifères, sa sous-régulation influencerait les réactions de N, 2O et 6O-sulfations [407]. Les cellules CHO-3E7 exhibent ainsi des chaînes d'héparanes sulfates présentant une séquence de disaccharides sulfatés unique qui détermine la

fonction biologique de chaque HSPG. Cette observation ne remet pas en question les résultats concernant l'internalisation des polyplexes, l'affinité spécifique des HSPG pour les polyplexes ou encore leur capacité de dissociation des polyplexes, mais restreint les résultats au modèle cellulaire CHO-3E7. De manière surprenante, l'expression stable des protéoglycanes à héparane sulfate dans les cellules CHO<sup>BRI</sup> n'a pas d'effet sur l'internalisation des polyplexes et l'expression du transgène. Ce résultat est le reflet de l'instabilité génomique des cellules CHO [48]. En effet, les CHO<sup>BRI</sup> sont non seulement incapables d'exprimer l'enzyme 3-OST mais aussi l'enzyme Glc5-épimérase essentielle aux réactions de O-sulfations des héparanes sulfates. L'absence d'une augmentation visible de la sulfation suite à la surexpression des protéoglycanes à héparane sulfate pourrait expliquer en partie nos résultats de l'approche « expression stable ». Il existe donc des différences substantielles entre les lignées cellulaires CHO qui compliquent énormément la compréhension des mécanismes sous-jacents au transfert de gène et l'interprétation des données publiées. A l'avenir, le développement et la maintenance d'une lignée cellulaire CHO de référence serait un atout de valeur. De plus, afin de répondre à la problématique concernant le rôle individuel des protéoglycanes à héparane sulfate dans le transfert de gène, nous pourrions dans un premier temps changer de modèle cellulaire, en choisissant par exemple les cellules HEK293 ou bien co-exprimer dans les cellules CHO<sup>BRI</sup> les enzymes manquantes de la voie de biosynthèse des HSPG.

## Perspectives Générales

Bien que des perspectives futures aient été proposé dans la cadre de chaque étude afin de contourner les diverses limitations, si je devais répondre à la question suivante : « quelles sont les approches que tu suggèrerais dans le contexte étudié en te basant sur tes cinq années de travail ? », je répondrais que de toute évidence, la fréquence des réactions de sulfation qui caractérise l'étape de modification des chaînes d'héparanes sulfates est un paramètre important influençant le polymorphisme des chaînes d'héparanes sulfate. Ainsi, dans le but de mieux comprendre les relations structures / activités des protéoglycanes à héparane sulfate, il serait intéressant, dans un premier, de définir précisément la quantité de sulfate de chaque HSPG et la rapporter à leur capacité à interagir avec les polyplexes. L'hétérogénéité des chaînes d'héparanes sulfates est une limite à la détermination de leur contenu et leur signature en sulfate.

Nous avons tenté d'élaborer une méthode de quantification simple, robuste et rapide pour déterminer le contenu en sulfate des protéoglycanes à héparane sulfate. Ce travail a été réalisé par un étudiant à la maîtrise sous ma supervision pendant une période de 6 mois environ. Nous avons développé un essai colorimétrique basé sur l'utilisation d'un complexe coloré (le rhodizonate de barium) qui se dissocie en présence de sulfate inorganique et aboutit à une diminution d'absorbance proportionnelle à la quantité de sulfate présent dans l'échantillon. Ce travail nécessite encore des ajustements au niveau de la méthode de préparation des échantillons. Les conditions de pyrolyse utilisées (obtention des sulfates inorganiques) se sont avérées être une limite à la méthode de quantification. Néanmoins, la quantification du contenu en sulfate de chaque HSPG produit dans un type cellulaire particulier permettrait sans doute de mieux comprendre leur fonction spécifique vis-à-vis du transfert de gène. Il est cependant possible que le contenu en sulfate de chaque HSPG ne soit pas corrélé à leur habileté à lier les polyplexes et à conduire à une transfection efficace. Ainsi, dans un deuxième temps, il serait pertinent d'identifier des motifs particuliers présents au niveau des chaînes d'héparanes sulfates capables de lier de manière spécifique les polyplexes et de déterminer si cette interaction est bénéfique quant au cheminement intracellulaire des polyplexes jusqu'au noyau cellulaire.

D'un point de vue pratique et dans le but d'augmenter les rendements de production de r-protéines, il serait intéressant d'identifier des HSPG ayant un impact bénéfique sur l'efficacité de transfection (comme c'est le cas pour le SDC1 par exemple) et de vérifier si la surexpression de ces derniers augmente de manière significative les rendements de production à grande échelle. Le développement d'une lignée cellulaire CHO ou HEK293 supportant une production rapide de r-protéine robuste et efficace serait un atout pour l'industrie pharmaceutique.

## **Mot de la fin ...**

Il est parfois déroutant d'être confronté à la complexité du processus de transfert de gène dans les cellules de mammifères faisant participer un grand nombre d'entités en interaction. Les travaux de recherche doivent persister afin de mettre à jour les détails du mécanisme moléculaire du transfert de gène dans les cellules de mammifères, et dessiner une image plus juste du rôle des protéoglycanes à héparane sulfate dans le transfert de gène.

## Bibliographie

- [1] P. Tambourin, Biotechnologies, Encycl. Universalis. (2007) 196–201. <http://www.universalis.fr/encyclopedie/biotechnologies/>.
- [2] V. Orel, R.J. Wood, Essence and origin of Mendel's discovery, Comptes Rendus l'Academie Des Sci. - Ser. III. 323 (2000) 1037–1041. doi:10.1016/S0764-4469(00)01266-X.
- [3] J.D. Watson, F.H.C. Crick, Molecular structure of nucleic acids, Nature. 171 (1953) 737–738. doi:10.1097/BLO.0b013e3181468780.
- [4] F. Crick, On protein synthesis, Symp. Soc. Exp. Biol. 12 (1958) 138–163. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13580867>.
- [5] F. Crick, Central dogma of molecular biology, Nature. 227 (1970) 561–563.
- [6] J. Matthaei, M. Nirenberg, Characteristics and stabilization of DNAase-sensitive protein synthesis in E. coli extracts., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 47 (1961) 1580–8. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=223177&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [7] H.G. Khorana, Synthesis in the study of nucleic acids. The Fourth Jubilee Lecture., Biochem. J. 109 (1968) 709–725.
- [8] M. Nirenberg, P. Leder, M. Bernfield, R. Brimacombe, J. Trupin, F. Rottman, et al., RNA codewords and protein synthesis, VII. On the general nature of the RNA code., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 53 (1965) 1161–1168. doi:10.1073/pnas.53.5.1161.
- [9] W. Arber, Host-controlled modification of bacteriophage, Annu. Rev. Microbiol. 19 (1965) 365–378.
- [10] D. Jackson, R. Symons, P. Berg, Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of Escherichia coli., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 69 (1972) 2904–2909. doi:10.1073/pnas.69.10.2904.
- [11] S.N. Cohen, A.C. Chang, L. Hsu, Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 69 (1972) 2110–4. doi:10.1073/pnas.69.8.2110.
- [12] S.N. Cohen, A.C.Y. Chang, H.W. Boyert, R.B. Hellingt, Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro, Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 70 (1973) 3240–3244.
- [13] K. Itakura, T. Hirose, R. Crea, A. Riggs, H. Heyneker, F. Bolivar, et al., Expression in Escherichia coli of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin, Science (80-. ). 198 (1977) 1056–1063.
- [14] L. Villa-Komaroff, a Efstratiadis, S. Broome, P. Lomedico, R. Tizard, S.P. Naber, et al., A bacterial clone synthesizing proinsulin., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75 (1978) 3727–3731. doi:10.1073/pnas.75.8.3727.
- [15] D. V Goeddel, D.G. Kleid, F. Bolivar, H.L. Heyneker, D.G. Yansura, R. Crea, et al., Expression in Escherichia coli of chemically synthesized genes for human insulin., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76 (1979) 106–110. doi:10.1073/pnas.76.1.106.
- [16] P.L. Pham, A. Kamen, Y. Durocher, Large-Scale Transfection of Mammalian Cells for the Fast Production of Recombinant Protein, Mol. Biotechnol. 34 (2006) 225–237.
- [17] J. Highsmith, Biologic therapeutic drugs: technologies and global markets, 2015.
- [18] Thérapeutiques en santé humaine CNRC, 2015. <http://www.nrc-cnrc.gc.ca/obj/doc/rd->

rd/hht-ptsh/hht\_factsheet\_f.pdf.

- [19] L.M. Keefer, M.A. Piron, P. De Meyts, Human insulin prepared by recombinant DNA techniques and native human insulin interact identically with insulin receptors., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78 (1981) 1391–5. doi:10.1073/pnas.78.3.1391.
- [20] F. Blattner et al, The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12, *Science* (80-. ). 2771613 (1997) 1453–1462.
- [21] J. Betton, A. Chaffotte, Replément et production de protéines recombinantes, *Med. Sci.* 21 (2005) 613–617.
- [22] D.N. Collier, *Escherichia coli* signal peptides direct inefficient secretion of an outer membrane protein (OmpA) and periplasmic proteins (maltose-binding protein, ribose-binding protein, and alkaline phosphatase) in *Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol.* 176 (1994) 3013–3020.
- [23] H. Lichenstein, M.E. Brawner, L.M. Miles, C.A. Meyers, P.R. Young, P.L. Simon, et al., Secretion of Interleukin-13 and *Escherichia coli* Galactokinase by *Streptomyces lividans* A ~ SinaI, 170 (1988) 3924–3929.
- [24] T.W. Overton, Recombinant protein production in bacterial hosts, *Drug Discov. Today.* 19 (2014) 590–601. doi:10.1016/j.drudis.2013.11.008.
- [25] R. Chen, Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond, *Biotechnol. Adv.* 30 (2012) 1102–1107. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.09.013.
- [26] S.R.P. Jaffé, B. Strutton, Z. Levarski, J. Pandhal, P.C. Wright, *Escherichia coli* as a glycoprotein production host: recent developments and challenges, *Curr. Opin. Biotechnol.* 30 (2014) 205–210. doi:10.1016/j.copbio.2014.07.006.
- [27] W.J. McAleer, E.B. Buynak, R.Z. Maigetter, W.J. Wampler, Eugene D Miller, M.R. Hilleman, Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast, *Nature.* 307 (1984) 178–180. doi:doi:10.1038/307178a0.
- [28] E. Celik, P. Calık, Production of recombinant proteins by yeast cells., *Biotechnol. Adv.* 30 (2012) 1108–18. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.09.011.
- [29] S.R. Hamilton, R.C. Davidson, N. Sethuraman, J.H. Nett, Y. Jiang, S. Rios, et al., Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins, *Science* (80-. ). 313 (2006) 1441–1443. doi:10.1126/science.1130256.
- [30] D.B. Oh, J.S. Park, M.W. Kim, S.A. Cheon, E.J. Kim, H.Y. Moon, et al., Glycoengineering of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* for the production of glycoproteins with trimannosyl core N-glycan by blocking core oligosaccharide assembly, *Biotechnol. J.* 3 (2008) 659–668. doi:10.1002/biot.200700252.
- [31] T. Ohashi, Y. Ikeda, N. Tanaka, S. Nakakita, S. Natsuka, Y. GIGA-HAMA, et al., The och1 mutant of *Schizosaccharomyces pombe* produces galactosylated core structures of N -Linked oligosaccharides, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73 (2009) 407–414. doi:10.1271/bbb.80712.
- [32] M. Hasslacher, M. Schall, M. Hayn, R. Bona, K. Rumbold, J. Lückl, et al., High-Level Intracellular Expression of Hydroxynitrile Lyase from the Tropical Rubber Tree *Hevea brasiliensis* in Microbial Hosts, *Protein Expr. Purif.* 11 (1997) 61–71. doi:http://dx.doi.org/10.1006/prep.1997.0765.
- [33] J.J. Clare, F.B. Rayment, S.P. Ballantine, K. Sreekrishna, M.A. Romanos, High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene, *Nat. Biotechnol.* 9 (1991) 455–460.
- [34] M.A. Meehl, T.A. Stadheim, Biopharmaceutical discovery and production in yeast, *Curr.*

- Opin. Biotechnol. 30 (2014) 120–127. doi:10.1016/j.copbio.2014.06.007.
- [35] I. Marchal, a M. Mir, D. Kmićik, a Verbert, R. Cacan, Use of inhibitors to characterize intermediates in the processing of N-glycans synthesized by insect cells: a metabolic study with Sf9 cell line., *Glycobiology*. 9 (1999) 645–54. doi:10.1093/glycob/9.7.645.
  - [36] J.J. Aumiller, J.R. Hollister, D.L. Jarvis, A transgenic insect cell line engineered to produce CMP-sialic acid and sialylated glycoproteins, *Glycobiology*. 13 (2003) 497–507. doi:10.1093/glycob/cwg051.
  - [37] H. Mabashi-Asazuma, X. Shi, C. Geisler, C.W. Kuo, K.H. Khoo, D.L. Jarvis, Impact of a human CMP-sialic acid transporter on recombinant glycoprotein sialylation in glycoengineered insect cells, *Glycobiology*. 23 (2013) 199–210. doi:10.1093/glycob/cws143.
  - [38] C. Prenner, L. Mach, J. Glössl, L. März, The antigenicity of the carbohydrate moiety of an insect glycoprotein, honey-bee (*Apis mellifera*) venom phospholipase A2. The role of alpha 1,3-fucosylation of the asparagine-bound N-acetylglucosamine., *Biochem. J.* 284 (Pt 2 (1992) 377–380.
  - [39] J. Xu, M.C. Dolan, G. Medrano, C.L. Cramer, P.J. Weathers, Green factory: Plants as bioproduction platforms for recombinant proteins, *Biotechnol. Adv.* 30 (2012) 1171–1184. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.020.
  - [40] Medicago Inc., (n.d.). <http://www.medicago.com/>.
  - [41] Planet Biotechnology, Inc., (n.d.). <http://www.planetbiotechnology.com/>.
  - [42] J.W. Larrick, D.W. Thomas, Producing proteins in transgenic plants and animals, *Curr. Opin. Biotechnol.* 12 (2001) 411–418. doi:10.1016/S0958-1669(00)00236-6.
  - [43] J. Peters, E. Stoger, Transgenic crops for the production of recombinant vaccines and anti-microbial antibodies., *Hum. Vaccin.* 7 (2011) 367–374. doi:10.4161/hv.7.3.14303.
  - [44] K.P. Jayapal, W.-S. Hu, K.F. Wlaschin, M.G.S. Yap, Recombinant Protein Therapeutics from CHO Cells — 20 Years and Counting, in: *CHO Consort. - SBE Spec. Ed.*, 2007: pp. 40–47.
  - [45] A. de Marco, Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*., *Microb. Cell Fact.* 8 (2009) 26. doi:10.1186/1475-2859-8-26.
  - [46] T.T. Puck, S.J. Cieciura, a Robinson, Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects., *J. Exp. Med.* 108 (1958) 945–956. doi:10.1084/jem.108.6.945.
  - [47] X. Xu, H. Nagarajan, N.E. Lewis, S. Pan, Z. Cai, X. Liu, et al., The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cell line., *Nat. Biotechnol.* 29 (2011) 735–41. doi:10.1038/nbt.1932.
  - [48] N.E. Lewis, X. Liu, Y. Li, H. Nagarajan, G. Yerganian, E. O'Brien, et al., Genomic landscapes of Chinese hamster ovary cell lines as revealed by the *Cricetulus griseus* draft genome., *Nat. Biotechnol.* 31 (2013) 759–67. doi:10.1038/nbt.2624.
  - [49] S. Fischer, R. Handrick, K. Otte, The art of CHO cell engineering: A comprehensive retrospect and future perspectives, *Biotechnol. Adv.* 33 (2015) 1878–1896. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.10.015.
  - [50] A.D. Bandaranayake, S.C. Almo, Recent advances in mammalian protein production, *FEBS Lett.* 588 (2014) 253–260. doi:10.1016/j.micinf.2011.07.011.Innate.
  - [51] S.C. Almo, J.D. Love, Better and faster: Improvements and optimization for mammalian recombinant protein production, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 26 (2014) 39–43.

- doi:10.1016/j.sbi.2014.03.006.
- [52] D.L. Hacker, D. Kiseljak, Y. Rajendra, S. Thurnheer, L. Baldi, F.M. Wurm, Polyethyleneimine-based transient gene expression processes for suspension-adapted HEK-293E and CHO-DG44 cells, *Protein Expr. Purif.* 92 (2013) 67–76. doi:10.1016/j.pep.2013.09.001.
  - [53] L. Delafosse, P. Xu, Y. Durocher, Comparative study of polyethylenimines for transient gene expression in mammalian HEK293 and CHO cells, *J. Biotechnol.* In press (2016).
  - [54] S. Fischer, N. Charara, A. Gerber, J. Wölfel, G. Schiedner, B. Voedisch, et al., Transient recombinant protein expression in a human amniocyte cell line: the CAP-T® cell system., *Biotechnol. Bioeng.* 109 (2012) 2250–61. doi:10.1002/bit.24514.
  - [55] A. Croset, L. Delafosse, J.-P. Gaudry, C. Arod, L. Glez, C. Losberger, et al., Differences in the glycosylation of recombinant proteins expressed in HEK and CHO cells., *J. Biotechnol.* 161 (2012) 336–48. doi:10.1016/j.jbiotec.2012.06.038.
  - [56] S.M. Browne, M. Al-Rubeai, Selection methods for high-producing mammalian cell lines, *Trends Biotechnol.* 25 (2007) 425–432. doi:10.1016/j.tibtech.2007.07.002.
  - [57] O. Danos, Thérapeutique - Thérapie génique, *Encycl. Universalis.* (n.d.). <http://www.universalis.fr/encyclopedie/therapeutique-therapie-genique/>.
  - [58] P.L. Felgner, Y. Barenholz, J.P. Behr, S.H. Cheng, P. Cullis, L. Huang, et al., Nomenclature for Synthetic Gene Delivery Systems, *Hum. Gene Ther.* 8 (1997) 511–512.
  - [59] G. Gregoriadis, Targeting of drugs, *Nat. Rev. Drug Discov.* 265 (1997) 407–411.
  - [60] C. Nicolau, a Le Pape, P. Soriano, F. Fargette, M.F. Juhel, In vivo expression of rat insulin after intravenous administration of the liposome-entrapped gene for rat insulin I., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80 (1983) 1068–72. doi:10.1073/pnas.80.4.1068.
  - [61] M. Fountain, V. Ganjam, R. Schultz, Liposome carrier vehicle for triiodothyronine, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 9 (1982) 101–105.
  - [62] P.L. Felgner, T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wenz, et al., Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84 (1987) 7413–7417. doi:10.1073/pnas.84.21.7413.
  - [63] R. Labas, F. Beilvert, B. Barteau, S. David, R. Chèvre, B. Pitard, Nature as a source of inspiration for cationic lipid synthesis, *Genetica.* 138 (2010) 153–168. doi:10.1007/s10709-009-9405-8.
  - [64] S. Zhang, Y. Xu, B. Wang, W. Qiao, D. Liu, Z. Li, Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery, *J. Control. Release.* 100 (2004) 165–180. doi:10.1016/j.jconrel.2004.08.019.
  - [65] A.J. Lin, N.L. Slack, A. Ahmad, I. Koltover, C.X. George, C.E. Samuel, et al., Structure and structure-function studies of lipid/plasmid DNA complexes, *J Drug Target.* 8 (2000) 13–27. doi:10.3109/10611860009009206.
  - [66] L. Stamatatos, R. Leventis, M. Zuckermann, J. Silvius, Interactions of cationic lipid vesicles with negatively charged phospholipid vesicles and biological membranes, *Biochemistry.* 27 (1988) 3917–3925.
  - [67] T. Montier, T. Benvegna, P.-A. Jaffrès, J.-J. Yaouanc, P. Lehn, Progress in cationic lipid-mediated gene transfection: a series of bio-inspired lipids as an example., *Curr. Gene Ther.* 8 (2008) 296–312. doi:10.2174/156652308786070989.
  - [68] J.P. Behr, B. Demeneix, J.P. Loeffler, J. Perez-Mutel, Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipolyamine-coated DNA,

- Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 86 (1989) 6982–6986.
- [69] T. Ren, Y.K. Song, G. Zhang, D. Liu, Structural basis of DOTMA for its high intravenous transfection activity in mouse., *Gene Ther.* 7 (2000) 764–768. doi:10.1038/sj.gt.3301153.
  - [70] H. Lv, S. Zhang, B. Wang, S. Cui, J. Yan, Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery, *J. Control. Release.* 114 (2006) 100–109. doi:10.1016/j.jconrel.2006.04.014.
  - [71] M.C.P. De Lima, Cationic lipid – DNA complexes in gene delivery : from biophysics to biological applications, 47 (2001) 277–294.
  - [72] R. Koynova, L. Wang, R.C. MacDonald, Cationic phospholipids forming cubic phases: Lipoplex structure and transfection efficiency, *Mol. Pharm.* 5 (2008) 739–744. doi:10.1021/mp800011e.
  - [73] D.E. Olins, A.L. Olins, P.H. von Hippel, Model nucleoprotein complexes: Studies on the interaction of cationic homopolypeptides with DNA, *J. Mol. Biol.* 24 (1967) 157–176.
  - [74] G.Y. Wu, C.H. Wu, Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 4429–4432.
  - [75] M. Wolfert, L. Seymour, Atomic force microscopic analysis of the influence of the molecular weight of poly(L)lysine on the size of polyelectrolyte complexes formed with DNA, *Gene Ther.* 3 (1996) 269–273.
  - [76] E. Wagner, M. Cotten, R. Foisner, M.L. Birnstiel, Transferrin-polycation-DNA complexes: the effect of polycations on the structure of the complex and DNA delivery to cells., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88 (1991) 4255–4259. doi:10.1073/pnas.88.10.4255.
  - [77] J.C. Perales, T. Ferkol, H. Beegen, O.D. Ratnoff, R.W. Hanson, Gene transfer in vivo: Sustained expression and regulation of genes introduced into the liver by receptor-targeted uptake, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 91 (1994) 4086–4090.
  - [78] D.Y. Kwok, C.C. Coffin, C.P. Lollo, J. Jovenal, M.G. Banaszczyk, P. Mullen, et al., Stabilization of poly-L-lysine/DNA polyplexes for in vivo gene delivery to the liver, *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 1444 (1999) 171–190. doi:10.1016/S0167-4781(98)00274-7.
  - [79] D. Mazia, G. Schatten, W. Sale, Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy, *J. Cell Biol.* 66 (1975) 198–200. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
  - [80] Y.H. Choi, F. Liu, J.S. Kim, Y.K. Choi, J.S. Park, S.W. Kim, Polyethylene glycol-grafted poly-L-lysine as polymeric gene carrier, *J. Control. Release.* 54 (1998) 39–48. doi:10.1016/S0168-3659(97)00174-0.
  - [81] L. Jin, X. Zeng, M. Liu, Y. Deng, N. He, Current progress in gene delivery technology based on chemical methods and nano-carriers, *Theranostics.* 4 (2014) 240–255. doi:10.7150/thno.6914.
  - [82] M.A. Mintzer, E.E. Simanek, Nonviral Vectors for Gene Delivery, *Chem. Rev.* (Washington, DC, U. S.). 109 (2009) 259–302. doi:10.1021/cr800409e.
  - [83] H. Yin, R.L. Kanasty, A. a. Eltoukhy, A.J. Vegas, J.R. Dorkin, D.G. Anderson, Non-viral vectors for gene-based therapy, *Nat. Rev. Genet.* 15 (2014) 541–555. doi:10.1038/nrg3763.
  - [84] G.Y. Wu, C.H. Wu, Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 14621–14624. doi:10.1016/0014-2999(90)91416-9.
  - [85] M.W. Konstan, P.B. Davis, J.S. Wagener, K. a Hilliard, R.C. Stern, L.J.H. Milgram, et



- al., Compacted DNA nanoparticles administered to the nasal mucosa of cystic fibrosis subjects are safe and demonstrate partial to complete cystic fibrosis transmembrane regulator reconstitution., *Hum. Gene Ther.* 15 (2004) 1255–1269. doi:10.1089/hum.2004.15.ft-2.
- [86] M. Ohsaki, T. Okuda, A. Wada, T. Hirayama, T. Niidome, H. Aoyagi, In vitro gene transfection using dendritic poly(L-lysine), *Bioconjug. Chem.* 13 (2002) 510–517. doi:10.1021/bc015525a.
- [87] D. Oupicky, K.A. Howard, ??estm??r Ko????k, P.R. Dash, K. Ulbrich, L.W. Seymour, Steric stabilization of poly-L-lysine/DNA complexes by the covalent attachment of semitelechelic poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide], *Bioconjug. Chem.* 11 (2000) 492–501. doi:10.1021/bc990143e.
- [88] A. Maruyama, H. Watanabe, A. Ferdous, M. Katoh, T. Ishihara, T. Akaike, Characterization of interpolyelectrolyte complexes between double-stranded DNA and polylysine comb-type copolymers having hydrophilic side chains, *Bioconjug. Chem.* 9 (1998) 292–299. doi:10.1021/bc9701510.
- [89] F. Szoka, J. Haensler, Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture, *Bioconjug. Chem.* 4 (1993) 372–379.
- [90] H. Zhong, Z. He, Z. Li, G. Li, S. Shen, X. Li, Studies on Polyamidoamine Dendrimers as Efficient Gene, *J. Biomater. Appl.* 22 (2008) 527–544. doi:10.1177/0885328207080005.
- [91] A.U. Bielinska, J.F. Kukowska-Latallo, J.R. Baker, The interaction of plasmid DNA with polyamidoamine dendrimers: Mechanism of complex formation and analysis of alterations induced in nuclease sensitivity and transcriptional activity of the complexed DNA, *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 1353 (1997) 180–190. doi:10.1016/S0167-4781(97)00069-9.
- [92] J.F. Kukowska-Latallo, a U. Bielinska, J. Johnson, R. Spindler, D. a Tomalia, J.R. Baker, Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 4897–4902. doi:10.1073/pnas.93.10.4897.
- [93] J.-S. Kim, A. Maruyama, T. Akaike, S.W. Kim, Terplex DNA delivery system as a gene carrier, *Pharm. Res.* 15 (1998) 116–121.
- [94] S.M. Moghimi, Nanomedicine: current status and future prospects, *FASEB J.* 19 (2005) 311–330. doi:10.1096/fj.04-2747rev.
- [95] M.X. Tang, C.T. Redemann, F.C. Szoka, In Vitro Gene Delivery by Degraded Polyamidoamine Dendrimers, *Bioconjug. Chem.* 7 (1996) 703–714. doi:10.1021/bc00023a012.
- [96] N. Shah, R.J. Steptoe, H.S. Parekh, Low-generation asymmetric dendrimers exhibit minimal toxicity and effectively complex DNA, *J. Pept. Sci.* 17 (2011) 470–478. doi:10.1002/psc.1347.
- [97] H. Liu, H. Wang, W. Yang, Y. Cheng, Disulfide cross-linked low generation dendrimers with high gene transfection efficacy, low cytotoxicity, and low cost, *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 17680–17687. doi:10.1021/ja307290j.
- [98] K.L. Killops, L.M. Campos, C.J. Hawker, Robust, efficient, and orthogonal synthesis of dendrimers via thiol-ene “click” chemistry, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 5062–5064. doi:10.1021/ja8006325.
- [99] M. Rinaudo, Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials, *Polym. Int.* 57 (2008) 397–430. doi:10.1002/pi.

- [100] T. Chandy, C.P. Sharma, Chitosan-as a biomaterial, *Biomater. Artif. Cells, Artif. Organs.* 18 (1990) 1–24.
- [101] M. Lavertu, S. Methot, N. Tran-Khanh, M.D. Buschmann, High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation, *Biomaterials.* 27 (2006) 4815–4824. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.04.029.
- [102] G. Borchard, Chitosans for gene delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 52 (2001) 145–150. doi:10.1016/S0169-409X(01)00198-3.
- [103] K. Nagpal, S.K. Singh, D.N. Mishra, Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery., *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* 58 (2010) 1423–1430. doi:10.1248/cpb.58.1423.
- [104] M. Thibault, S. Nimesh, M. Lavertu, M.D. Buschmann, Intracellular trafficking and decondensation kinetics of chitosan-pDNA polyplexes., *Mol. Ther.* 18 (2010) 1787–95. doi:10.1038/mt.2010.143.
- [105] S. Mao, W. Sun, T. Kissel, Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62 (2010) 12–27. doi:10.1016/j.addr.2009.08.004.
- [106] T. Sato, T. Ishii, Y. Okahata, In vitro gene delivery mediated by chitosan. Effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency, *Biomaterials.* 22 (2001) 2075–2080. doi:10.1016/S0142-9612(00)00385-9.
- [107] K. Turan, K. Nagata, Chitosan-DNA nanoparticles: the effect of cell type and hydrolysis of chitosan on in vitro DNA transfection., *Pharm. Dev. Technol.* 11 (2006) 503–12. doi:10.1080/10837450600940873.
- [108] W. Sajomsang, P. Gonil, U.R. Ruktanonchai, M. Petchsangsa, P. Opanasopit, S. Puttipipatkachorn, Effects of molecular weight and pyridinium moiety on water-soluble chitosan derivatives for mediated gene delivery, *Carbohydr. Polym.* 91 (2013) 508–517. doi:10.1016/j.carbpol.2012.08.053.
- [109] S. Mansouri, P. Lavigne, K. Corsi, M. Benderdour, E. Beaumont, J.C. Fernandes, Chitosan-DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: Strategies to improve transfection efficacy, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 57 (2004) 1–8. doi:10.1016/S0939-6411(03)00155-3.
- [110] T. Ishii, Y. Okahata, T. Sato, Mechanism of cell transfection with plasmid / chitosan complexes, *Biochim. Biophys. Acta.* 1514 (2001) 51–64.
- [111] M. Köping-Höggård, K.M. Vårum, M. Issa, S. Danielsen, B.E. Christensen, B.T. Stokke, et al., Improved chitosan-mediated gene delivery based on easily dissociated chitosan polyplexes of highly defined chitosan oligomers., *Gene Ther.* 11 (2004) 1441–1452. doi:10.1038/sj.gt.3302312.
- [112] X. Zhao, S.B. Yu, F.L. Wu, Z. Bin Mao, C.L. Yu, Transfection of primary chondrocytes using chitosan-pEGFP nanoparticles, *J. Control. Release.* 112 (2006) 223–228. doi:10.1016/j.jconrel.2006.01.016.
- [113] M. Prabakaran, J.F. Mano, Chitosan-Based Particles as Controlled Drug Delivery Systems, *Drug Deliv.* 12 (2004) 41–57. doi:10.1080/10717540590889781.
- [114] W.F. Lai, M.C.M. Lin, Nucleic acid delivery with chitosan and its derivatives, *J. Control. Release.* 134 (2009) 158–168. doi:10.1016/j.jconrel.2008.11.021.
- [115] O. Germershaus, S. Mao, J. Sitterberg, U. Bakowsky, T. Kissel, Gene delivery using chitosan, trimethyl chitosan or polyethylenglycol-graft-trimethyl chitosan block copolymers: Establishment of structure-activity relationships in vitro, *J. Control. Release.*

- 125 (2008) 145–154. doi:10.1016/j.jconrel.2007.10.013.
- [116] C. Liu, Q. Zhu, W. Wu, X. Xu, X. Wang, S. Gao, et al., Degradable copolymer based on amphiphilic N-octyl-N-quatenary chitosan and low-molecular weight polyethylenimine for gene delivery, *Int. J. Nanomedicine*. 7 (2012) 5339–5350. doi:10.2147/IJN.S36179.
- [117] O. Boussif, F. Lezoualc'h, M. a Zanta, M.D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, et al., A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 7297–301. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=41326&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [118] J.W. Wiseman, C. a Goddard, D. McLelland, W.H. Colledge, A comparison of linear and branched polyethylenimine (PEI) with DCChol/DOPE liposomes for gene delivery to epithelial cells in vitro and in vivo., *Gene Ther.* 10 (2003) 1654–62. doi:10.1038/sj.gt.3302050.
- [119] M. Thomas, J.J. Lu, Q. Ge, C. Zhang, J. Chen, A.M. Klibanov, Full deacylation of polyethylenimine dramatically boosts its gene delivery efficiency and specificity to mouse lung., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 5679–84. doi:10.1073/pnas.0502067102.
- [120] J.H. Jeong, S.H. Song, D.W. Lim, H. Lee, T.G. Park, DNA transfection using linear poly(ethylenimine) prepared by controlled acid hydrolysis of poly(2-ethyl-2-oxazoline)., *J. Control. Release*. 73 (2001) 391–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11516514>.
- [121] C. Tros de Ilarduya, Y. Sun, N. Düzgüneş, Gene delivery by lipoplexes and polyplexes., *Eur. J. Pharm. Sci.* 40 (2010) 159–70. doi:10.1016/j.ejps.2010.03.019.
- [122] J. Behr, The proton sponge: a trick to enter cells the viruses did not exploit, *Chim. Int. J. Chem.* 2 (1997) 34–36. <http://www.ingentaconnect.com/content/scs/chimia/1997/00000051/f0020001/art00026>.
- [123] J. Behr, L'éponge à protons : un moyen d'entrer dans une cellule auquel les virus n'ont pas pensé, *Med. Sci.* 12 (1996) 56–59.
- [124] W.T. Godbey, K.K. Wu, a G. Mikos, Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 5177–81. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=21837&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [125] P. Belguise-Valladier, J.P. Behr, Nonviral gene delivery: Towards artificial viruses., *Cytotechnology*. 35 (2001) 197–201. doi:10.1023/A:1013133605406.
- [126] D. Fischer, Y. Li, B. Ahlemeyer, J. Krieglstein, T. Kissel, In vitro cytotoxicity testing of polycations: Influence of polymer structure on cell viability and hemolysis, *Biomaterials*. 24 (2003) 1121–1131. doi:10.1016/S0142-9612(02)00445-3.
- [127] W.T. Godbey, K.K. Wu, A.G. Mikos, Size matters : Molecular weight affects the efficiency of poly ( ethylenimine ) as a gene delivery vehicle, *J. Biomed. Mater. Res.* 45 (1998) 268–275.
- [128] M. Neu, D. Fischer, T. Kissel, Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives, *J. Gene Med.* 7 (2005) 992–1009. doi:10.1002/jgm.773.
- [129] E. Carpentier, S. Paris, A. a Kamen, Y. Durocher, Limiting factors governing protein expression following polyethylenimine-mediated gene transfer in HEK293-EBNA1 cells., *J. Biotechnol.* 128 (2007) 268–80. doi:10.1016/j.jbiotec.2006.10.014.

- [130] C. Fortier, Y. Durocher, G. De Crescenzo, Surface modification of non-viral nanocarriers for enhanced gene delivery, *Nanomedicine*. 9 (2014) 135–151. doi:10.2217/nnm.13.194.
- [131] R. Deng, Y. Yue, F. Jin, Y. Chen, H.-F. Kung, M.C.M. Lin, et al., Revisit the complexation of PEI and DNA - how to make low cytotoxic and highly efficient PEI gene transfection non-viral vectors with a controllable chain length and structure?, *J. Control. Release*. 140 (2009) 40–6. doi:10.1016/j.jconrel.2009.07.009.
- [132] S.-H. Huh, H.-J. Do, H.-Y. Lim, D.-K. Kim, S.-J. Choi, H. Song, et al., Optimization of 25 kDa linear polyethylenimine for efficient gene delivery., *Biologicals*. 35 (2007) 165–71. doi:10.1016/j.biologicals.2006.08.004.
- [133] M. Thomas, A.M. Klibanov, Enhancing polyethylenimine's delivery of plasmid DNA into mammalian cells., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 14640–5. doi:10.1073/pnas.192581499.
- [134] C. Wang, X. Luo, Y. Zhao, L. Han, X. Zeng, M. Feng, et al., Influence of polyanion on physicochemical properties and biological activities of, 2012.
- [135] A. Aied, U. Greiser, A. Pandit, W. Wang, Polymer gene delivery: Overcoming the obstacles, *Drug Discov. Today*. 18 (2013) 1090–1098. doi:10.1016/j.drudis.2013.06.014.
- [136] X. Wang, D. Niu, C. Hu, P. Li, Polyethyleneimine-Based Nanocarriers for Gene Delivery, *Curr. Pharm. Des.* 21 (2015) 6140–6156.
- [137] N.P. Gabrielson, D.W. Pack, Acetylation of polyethylenimine enhances gene delivery via weakened polymer/DNA interactions., *Biomacromolecules*. 7 (2006) 2427–35. doi:10.1021/bm060300u.
- [138] M.L. Forrest, G.E. Meister, J.T. Koerber, D.W. Pack, Partial Acetylation of Polyethylenimine Enhances In Vitro Gene Delivery, *Pharm. Res.* 21 (2004) 365–371.
- [139] Z. Kadlecova, S. Nallet, D.L. Hacker, L. Baldi, H.-A. Klok, F.M. Wurm, Poly(ethyleneimine)-mediated large-scale transient gene expression: influence of molecular weight, polydispersity and N-propionyl groups., *Macromol. Biosci.* 12 (2012) 628–36. doi:10.1002/mabi.201100404.
- [140] S.-J. Sung, S.H. Min, K.Y. Cho, S. Lee, Y.-J. Min, Y. Il Yeom, et al., Effect of polyethylene glycol on gene delivery of polyethylenimine., *Biol. Pharm. Bull.* 26 (2003) 492–500. doi:10.1248/bpb.26.492.
- [141] H. Petersen, P.M. Fechner, A.L. Martin, K. Kunath, S. Stolnik, C.J. Roberts, et al., Polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol) copolymers: Influence of copolymer block structure on DNA complexation and biological activities as gene delivery system, *Bioconjug. Chem.* 13 (2002) 845–854. doi:10.1021/bc025529v.
- [142] K. Kunath, A. von Harpe, D. Fischer, H. Petersen, U. Bickel, K. Voigt, et al., Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery: comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and in vivo distribution with high-molecular-weight polyethylenimine., *J. Control. Release*. 89 (2003) 113–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12695067>.
- [143] D.D. Dunlap, a Maggi, M.R. Soria, L. Monaco, Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery., *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 3095–101. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=146867&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [144] D. Goula, J.S. Remy, P. Erbacher, M. Wasowicz, G. Levi, B. Abdallah, et al., Size, diffusibility and transfection performance of linear PEI/DNA complexes in the mouse central nervous system., *Gene Ther.* 5 (1998) 712–7. doi:10.1038/sj.gt.3300635.

- [145] L. Wightman, R. Kircheis, S. Carotta, R. Ruzicka, M. Kursa, Different behavior of branched and linear polyethylenimine for gene delivery in vitro and in vivo, (2001) 362–372.
- [146] S.K. Cho, C. Dang, X. Wang, R. Ragan, Y.J. Kwon, Mixing-sequence-dependent nucleic acid complexation and gene transfer efficiency by polyethylenimine, *Biomater. Sci.* 3 (2015) 1124–1133. doi:10.1039/C5BM00041F.
- [147] J.P. Clamme, J. Azoulay, Y. Mély, Monitoring of the formation and dissociation of polyethylenimine/DNA complexes by two photon fluorescence correlation spectroscopy., *Biophys. J.* 84 (2003) 1960–8. doi:10.1016/S0006-3495(03)75004-8.
- [148] S. Boeckle, K. von Gersdorff, S. van der Piepen, C. Culmsee, E. Wagner, M. Ogris, Purification of polyethylenimine polyplexes highlights the role of free polycations in gene transfer., *J. Gene Med.* 6 (2004) 1102–11. doi:10.1002/jgm.598.
- [149] Z. Dai, T. Gjetting, M. a Matthebjerg, C. Wu, T.L. Andresen, Elucidating the interplay between DNA-condensing and free polycations in gene transfection through a mechanistic study of linear and branched PEI., *Biomaterials.* 32 (2011) 8626–34. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.07.044.
- [150] Y. Yue, F. Jin, R. Deng, J. Cai, Z. Dai, M.C.M. Lin, et al., Revisit complexation between DNA and polyethylenimine--effect of length of free polycationic chains on gene transfection., *J. Control. Release.* 152 (2011) 143–51. doi:10.1016/j.jconrel.2011.03.020.
- [151] M. Hanzlíková, M. Ruponen, E. Galli, H. Tenhu, Mechanisms of polyethylenimine-mediated DNA delivery: free carrier helps to overcome the barrier of cell-surface glycosaminoglycans, *J. Gene Med.* (2011) 402–409. doi:10.1002/jgm.
- [152] W.T. Godbey, K.K. Wu, A.G. Mikos, Poly(ethylenimine)-mediated gene delivery affects endothelial cell function and viability, *Biomaterials.* 22 (2001) 471–480. doi:10.1016/S0142-9612(00)00203-9.
- [153] A. Beyerle, M. Irmeler, J. Beckers, T. Kissel, T. Stoeger, Toxicity pathway focused gene expression profiling of PEI-based polymers for pulmonary applications, *Mol. Pharm.* 7 (2010) 727–737. doi:10.1021/mp900278x.
- [154] S.M. Moghimi, P. Symonds, J.C. Murray, a C. Hunter, G. Debska, A. Szewczyk, A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy., *Mol. Ther.* 11 (2005) 990–5. doi:10.1016/j.ymthe.2005.02.010.
- [155] G. Grandinetti, N.P. Ingle, T.M. Reineke, Interaction of poly(ethylenimine)-DNA polyplexes with mitochondria: implications for a mechanism of cytotoxicity., *Mol. Pharm.* 8 (2011) 1709–19. doi:10.1021/mp200078n.
- [156] P. Midoux, G. Breuzard, J.P. Gomez, C. Pichon, Polymer-based gene delivery: a current review on the uptake and intracellular trafficking of polyplexes., *Curr. Gene Ther.* 8 (2008) 335–52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18855631>.
- [157] A. Bragonzi, A. Boletta, A. Biffi, A. Muggia, G. Sersale, S.H. Cheng, et al., Comparison between cationic polymers and lipids in mediating systemic gene delivery to the lungs., *Gene Ther.* 6 (1999) 1995–2004. doi:10.1038/sj.gt.3301039.
- [158] S.D. Li, L. Huang, Non-viral is superior to viral gene delivery, *J. Control. Release.* 123 (2007) 181–183. doi:10.1016/j.jconrel.2007.09.004.
- [159] F.M. Wurm, Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells., *Nat. Biotechnol.* 22 (2004) 1393–8. doi:10.1038/nbt1026.
- [160] X. Gao, K.-S. Kim, D. Liu, Nonviral gene delivery: what we know and what is next., *AAPS J.* 9 (2007) E92–104. doi:10.1208/aapsj0901009.

- [161] M.S. Al-Dosari, X. Gao, Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress., *AAPS J.* 11 (2009) 671–81. doi:10.1208/s12248-009-9143-y.
- [162] G. Nicolson, Update of the 1972 Singer-Nicolson Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure, *Discoveries.* 1 (2013) 1–14. doi:10.15190/d.2013.3.
- [163] T. Kirchhausen, Clathrin, *Annu. Rev. Biochem.* 69 (2000) 699–727.
- [164] E. Ungewickell, D. Branton, Assembly units of clathrin coats, *Nature.* 289 (1981) 420–422.
- [165] T. Kirchhausen, Adaptators for clathrin-mediated traffic, *Annu. Rev. Biochem.* 15 (1999) 705–732.
- [166] F.M. Brodsky, C. Chen, C. Knuehl, M.C. Towler, D.E. Wakeham, Biological basket weaving : Formation and Function of Clathrin-Coated Vesicles, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17 (2001) 517–68.
- [167] S.L. Schmid, M.A. McNiven, P. De Camilli, Dynamin and its partners: A progress report, *Curr. Opin. Cell Biol.* 10 (1998) 504–512. doi:10.1016/S0955-0674(98)80066-5.
- [168] W. Mallet, F. Maxfield, Endocytose, *Flammarion Medecine Sciences - actualités néphrologique*, 2000.
- [169] I. Mellman, R. Fuchs, A. Helenius, Acidification of the endocytic and exocytic pathways, *Annu. Rev. Biochem.* 55 (1986) 663–700.
- [170] A. Benmerah, C. Lamaze, Endocytose : chaque voie compte !, *Médecine / Sci.* 18 (2002) 1126–1136.
- [171] T. V Kurzchalia, R.G. Parton, Membrane microdomains and caveolae, *Curr. Opin. Cell Biol.* 11 (1999) 424–431.
- [172] K. Simons, D. Toomre, Lipid rafts and signal transduction., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1 (2000) 31–39. doi:10.1038/35036052.
- [173] C. Lamaze, A. Dujeancourt, T. Baba, C.G. Lo, A. Benmerah, A. Dautry-Varsat, Interleukin 2 receptors and detergent-resistant membrane domains define a clathrin-independent endocytic pathway, *Mol. Cell.* 7 (2001) 661–671. doi:10.1016/S1097-2765(01)00212-X.
- [174] A. El-Sayed, H. Harashima, Endocytosis of gene delivery vectors: from clathrin-dependent to lipid raft-mediated endocytosis., *Mol. Ther.* 21 (2013) 1118–30. doi:10.1038/mt.2013.54.
- [175] L. Pelkmans, J. Kartenbeck, a Helenius, Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER., *Nat. Cell Biol.* 3 (2001) 473–483. doi:10.1038/35074539.
- [176] G.P. Otto, B.J. Nichols, The roles of flotillin microdomains - endocytosis and beyond, *J. Cell Sci.* 124 (2011) 3933–3940. doi:10.1242/jcs.092015.
- [177] O.O. Glebov, N. a Bright, B.J. Nichols, Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells, *Nat. Cell Biol.* 8 (2006) 46–54. doi:10.1038/ncb1342.
- [178] D. Vercauteren, M. Piest, L.J. van der Aa, M. Al Soraj, A.T. Jones, J.F.J. Engbersen, et al., Flotillin-dependent endocytosis and a phagocytosis-like mechanism for cellular internalization of disulfide-based poly(amido amine)/DNA polyplexes., *Biomaterials.* 32 (2011) 3072–84. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.12.045.
- [179] C.A.O. Stuermer, Reggie/flotillin and the targeted delivery of cargo, *J. Neurochem.* 116 (2011) 708–713. doi:10.1111/j.1471-4159.2010.07007.x.
- [180] D.E. Saslowsky, J.A. Cho, H. Chinnapen, R.H. Massol, D.J.F. Chinnapen, J.S. Wagner,

- et al., Intoxication of zebrafish and mammalian cells by cholera toxin depends on the flotillin/reggie proteins but not Derlin-1 or -2, *J. Clin. Invest.* 120 (2010) 4399–4409. doi:10.1172/JCI42958.
- [181] M.F. Saeed, A.A. Kolokoltsov, T. Albrecht, R.A. Davey, Cellular entry of ebola virus involves uptake by a macropinocytosis-like mechanism and subsequent trafficking through early and late endosomes, *PLoS Pathog.* 6 (2010). doi:10.1371/journal.ppat.1001110.
- [182] M. Hao, F.R. Maxfield, Characterization of rapid membrane internalization and recycling, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 15279–15286. doi:10.1074/jbc.275.20.15279.
- [183] C. Pramfalk, J. Lanner, M. Andersson, E. Danielsson, C. Kaiser, I.-M. Renström, et al., Insulin receptor activation and down-regulation by cationic lipid transfection reagents., *BMC Cell Biol.* 5 (2004) 7. doi:10.1186/1471-2121-5-7.
- [184] K. von Gersdorff, N.N. Sanders, R. Vandenbroucke, S.C. De Smedt, E. Wagner, M. Ogris, The internalization route resulting in successful gene expression depends on both cell line and polyethylenimine polyplex type., *Mol. Ther.* 14 (2006) 745–53. doi:10.1016/j.ymthe.2006.07.006.
- [185] J. Rejman, A. Bragonzi, M. Conese, Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes, *Mol. Ther.* 12 (2005) 468–474. doi:10.1016/j.ymthe.2005.03.038.
- [186] M. van der Aa, U.S. Huth, S.Y. Häfele, R. Schubert, R.S. Oosting, E. Mastrobattista, et al., Cellular uptake of cationic polymer-DNA complexes via caveolae plays a pivotal role in gene transfection in COS-7 cells., *Pharm. Res.* 24 (2007) 1590–8. doi:10.1007/s11095-007-9287-3.
- [187] H. Hufnagel, P. Hakim, A. Lima, F. Hollfelder, Fluid phase endocytosis contributes to transfection of DNA by PEI-25., *Mol. Ther.* 17 (2009) 1411–7. doi:10.1038/mt.2009.121.
- [188] D.K. Sharma, A. Choudhury, R.D. Singh, C.L. Wheatley, D.L. Marks, R.E. Pagano, Glycosphingolipids internalized via caveolar-related endocytosis rapidly merge with the clathrin pathway in early endosomes and form microdomains for recycling, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 7564–7572. doi:10.1074/jbc.M210457200.
- [189] L. Pelkmans, T. Bürli, M. Zerial, A. Helenius, Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic, *Cell.* 118 (2004) 767–780. doi:10.1016/j.cell.2004.09.003.
- [190] S. Xiang, H. Tong, Q. Shi, J.C. Fernandes, T. Jin, K. Dai, et al., Uptake mechanisms of non-viral gene delivery, *J. Control. Release.* 158 (2012) 371–378. doi:10.1016/j.jconrel.2011.09.093.
- [191] H. Pollard, J.S. Remy, G. Loussouarn, S. Demolombe, J.P. Behr, D. Escande, Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells., *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 7507–11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9516451>.
- [192] M. Agirre, J. Zarate, E. Ojeda, G. Puras, J. Desbrieres, J.L. Pedraz, Low molecular weight chitosan (LMWC)-based poly[1] M. Agirre, J. Zarate, E. Ojeda, G. Puras, J. Desbrieres, J.L. Pedraz, Low molecular weight chitosan (LMWC)-based polyplexes for pDNA delivery: From bench to bedside, *Polymers (Basel).* 6 (2014) 1727–1755. , *Polymers (Basel).* 6 (2014) 1727–1755. doi:10.3390/polym6061727.
- [193] N. Nelson, Structure and pharmacology of the proton-ATPases, *Trends Pharmacol. Sci.* 12 (1991) 71–75.

- [194] N.D. Sonawane, F.C. Szoka, A.S. Verkman, Chloride Accumulation and Swelling in Endosomes Enhances DNA Transfer by Polyamine-DNA Polyplexes, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 44826–44831. doi:10.1074/jbc.M308643200.
- [195] A. Kichler, C. Leborgne, E. Coeytaux, O. Danos, Polyethylenimine-mediated gene delivery: A mechanistic study, *J. Gene Med.* 3 (2001) 135–144. doi:10.1002/jgm.173.
- [196] A. Akinc, M. Thomas, A.M. Klibanov, R. Langer, Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis, *J. Gene Med.* 7 (2005) 657–663. doi:10.1002/jgm.696.
- [197] W.T. Godbey, M.A. Barry, P. Saggau, K.K. Wu, A.G. Mikos, Poly(ethylenimine)-mediated transfection: A new paradigm for gene delivery, *J. Biomed. Mater. Res.* 51 (2000) 3211–328.
- [198] R. V Benjaminsen, M. Matthebjerg, J.S. Henriksen, M.S. Moghimi, T.L. Amdresen, The possible “proton sponge” effect of polyethylenimine (PEI) does not include change in lysosomal pH, *Mol. Ther.* 21 (2013) 149–157.
- [199] R.N. Cohen, M. Van de Aa, N. Macaraeg, A.P. Lee, F.J. Szoka, Quantification of Plasmid DNA Copies in the Nucleus after Lipoplex and Polyplex Transfection, *J. Control. Release.* 135 (2009) 166–174. doi:10.1016/j.jconrel.2008.12.016.Quantification.
- [200] D.J. Glover, D.L. Leyton, G.W. Moseley, D.A. Jans, The efficiency of nuclear plasmid DNA delivery is a critical determinant of transgene expression at the single cell lev, *J. Gene Med.* 12 (2010) 77–85.
- [201] E.M. Campbell, T.J. Hope, Role of the cytoskeleton in nuclear import, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55 (2003) 761–771. doi:10.1016/S0169-409X(03)00049-8.
- [202] S. Brunner, T. Sauer, S. Carotta, M. Cotten, M. Saltik, E. Wagner, Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus, *Gene Ther.* 7 (2000) 401–407.
- [203] I. Mortimer, P. Tam, I. MacLachlan, R.W. Graham, E.G. Saravolac, P.B. Joshi, Cationic lipid-mediated transfection of cells in culture requires mitotic activity., *Gene Ther.* 6 (1999) 403–411. doi:10.1038/sj.gt.3300837.
- [204] W.C. Tseng, F.R. Haselton, T.D. Giorgio, Mitosis enhances transgene expression of plasmid delivered by cationic liposomes, *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 1445 (1999) 53–64. doi:10.1016/S0167-4781(99)00039-1.
- [205] B. Abdallah, A. Hassan, C. Benoist, D. Goula, J. Behr, B. Demeneix, A powerful nonviral vector for in vivo gene transfer into the adult mammalian brain: polyethylenimine, *Hum. Gene Ther.* 7 (1996) 1947–1954.
- [206] R. Cartier, R. Reszka, Utilization of synthetic peptides containing nuclear localization signals for nonviral gene transfer systems., *Gene Ther.* 9 (2002) 157–167. doi:10.1038/sj/gt/3301635.
- [207] G. Breuzard, M. Tertilt, C. Goncalves, H. Cheradame, P. Guan, C. Pichon, et al., Nuclear delivery of NFkB-assisted DNA/polymer complexes: Plasmid DNA quantitation by confocal laser scanning microscopy and evidence of nuclear polyplexes by FRET imaging, *Nucleic Acids Res.* 36 (2008). doi:10.1093/nar/gkn287.
- [208] E.V.B. Van Gaal, R.S. Oosting, R. Van Eijk, M. Bakowska, D. Feyen, R.J. Kok, et al., DNA nuclear targeting sequences for non-viral gene delivery, *Pharm. Res.* 28 (2011) 1707–1722. doi:10.1007/s11095-011-0407-8.
- [209] T. Bieber, W. Meissner, S. Kostin, A. Niemann, H.P. Elsasser, Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine-DNA complexes, *J. Control. Release.* 82



- (2002) 441–454. doi:10.1016/S0168-3659(02)00129-3.
- [210] M. Bernfield, R. Kokenyesi, K. Masato, M. Hinkes T., J. Spring, R. Gallo L., et al., Biology of the syndecans a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans.pdf, *Annu. Rev. Biochem.* (1992) 365–393.
  - [211] D.L. Rabenstein, Heparin and heparan sulfate: structure and function, *Nat. Prod. Rep.* 19 (2002) 312–331. doi:10.1039/b100916h.
  - [212] C.L.R. Merry, M. Lyon, J. a. Deakin, J.J. Hopwood, J.T. Gallagher, Highly sensitive sequencing of the sulfated domains of heparan sulfate, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 18455–18462. doi:10.1074/jbc.274.26.18455.
  - [213] S.E. Stringer, J.T. Gallagher, Specific binding of the chemokine platelet factor 4 to heparan sulfate, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 20508–20514. doi:10.1074/jbc.272.33.20508.
  - [214] Z.L. Wu, L. Zhang, T. Yabe, B. Kuberan, D.L. Beeler, A. Love, et al., The involvement of heparan sulfate (HS) in FGF1/HS/FGFR1 signaling complex, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 17121–17129. doi:10.1074/jbc.M212590200.
  - [215] B.L. Allen, A.C. Rapraeger, Spatial and temporal expression of heparan sulfate in mouse development regulates FGF and FGF receptor assembly, *J. Cell Biol.* 163 (2003) 637–648. doi:10.1083/jcb.200307053.
  - [216] J.D. Esko, S.B. Selleck, Order out of chaos : Assembly of Ligand Binding Sites in Heparan Sulfate, *Annu. Rev. Biochem.* 71 (2002) 435–471. doi:10.1146/annurev.biochem.71.110601.135458.
  - [217] P. Carlsson, J. Presto, D. Spillmann, U. Lindahl, L. Kjellen, Heparin/Heparan Sulfate Biosynthesis: PROGRESSIVE FORMATION OF N-SULFATED DOMAINS, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 20008–20014. doi:10.1074/jbc.M801652200.
  - [218] B.L. Viviano, S. Paine-Saunders, N. Gasiunas, J. Gallagher, S. Saunders, Domain-specific Modification of Heparan Sulfate by Qsulf1 Modulates the Binding of the Bone Morphogenetic Protein Antagonist Noggin, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 5604–5611. doi:10.1074/jbc.M310691200.
  - [219] M. Morimoto-Tomita, K. Uchimura, A. Bistrup, D.H. Lum, M. Egeblad, N. Boudreau, et al., Sulf-2, a proangiogenic heparan sulfate endosulfatase, is upregulated in breast cancer., *Neoplasia*. 7 (2005) 1001–1010. doi:10.1593/neo.05496.
  - [220] X. Ai, A.T. Do, M. Kusche-Gullberg, U. Lindahl, K. Lu, C.P. Emerson, Substrate specificity and domain functions of extracellular heparan sulfate 6-O-endosulfatases, QSulf1 and QSulf2, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 4969–4976. doi:10.1074/jbc.M511902200.
  - [221] W.C. Lamanna, I. Kalus, M. Padva, R.J. Baldwin, C.L.R. Merry, T. Dierks, The heparanome—The enigma of encoding and decoding heparan sulfate sulfation, *J. Biotechnol.* 129 (2007) 290–307. doi:10.1016/j.jbiotec.2007.01.022.
  - [222] B. Mulloy, M.J. Forster, C. Jones, a F. Drake, E. a Johnson, D.B. Davies, The effect of variation of substitution on the solution conformation of heparin: a spectroscopic and molecular modelling study., *Carbohydr. Res.* 255 (1994) 1–26. doi:10.1016/S0008-6215(00)90968-6.
  - [223] B. Mulloy, M.J. Forster, Conformation and dynamics of heparin and heparan sulfate., *Glycobiology*. 10 (2000) 1147–56. doi:10.1093/glycob/10.11.1147.
  - [224] Z. Shriver, I. Capila, G. Venkataraman, R. Sasisekharan, Heparin and Heparan Sulfate: Analyzing Structure and Microheterogeneity, *Handb. Exp. Pharmacol.* 207 (2012) 159–176. doi:10.1007/978-3-642-23056-1.

- [225] J.R. Couchman, Transmembrane signaling proteoglycans., *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26 (2010) 89–114. doi:10.1146/annurev-cellbio-100109-104126.
- [226] E. Feyzi, T. Saldeen, E. Larsson, U. Lindahl, M. Salmivirta, Age-dependent modulation of heparan sulfate structure and function., *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 13395–13398. doi:10.1074/jbc.273.22.13395.
- [227] U. Lindahl, M. Kusche-Gullberg, L. Kjellen, Regulated diversity of heparan sulfate, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 24979–24982. doi:10.1074/jbc.273.39.24979.
- [228] F. Safaiyan, U. Lindahl, M. Salmivirta, Selective reduction of 6-O-sulfation in heparan sulfate from transformed mammary epithelial cells., *Eur. J. Biochem.* 252 (1998) 576–82. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9546676>.
- [229] G.C. Jayson, M. Lyon, C. Paraskeva, J.E. Turnbull, J.A. Deakin, J.T. Gallagher, Heparan sulfate undergoes specific structural changes during the progression from human colon adenoma to carcinoma in vitro, *J Biol Chem.* 273 (1998) 51–57. doi:10.1074/jbc.273.1.51.
- [230] Y.G. Brickman, M.D. Ford, D.H. Small, P.F. Bartlett, V. Nurcombe, Heparan sulfates mediate the binding of basic fibroblast growth factor to a specific receptor on neural precursor cells., *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 24941–24948. doi:10.1074/jbc.270.42.24941.
- [231] D. Xu, J.D. Esko, A Golgi-on-a-chip for glycan synthesis., *Nat. Chem. Biol.* 5 (2009) 612–613. doi:10.1038/nchembio0909-612.
- [232] J. Presto, M. Thuveson, P. Carlsson, M. Busse, M. Wilén, I. Eriksson, et al., Heparan sulfate biosynthesis enzymes EXT1 and EXT2 affect NDST1 expression and heparan sulfate sulfation., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 4751–6. doi:10.1073/pnas.0705807105.
- [233] J. Aikawa, K. Grobe, M. Tsujimoto, J.D. Esko, Multiple Isozymes of Heparan Sulfate/Heparin GlcNAc N-Deacetylase/GlcN N-Sulfotransferase, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 5876–82. doi:10.1074/jbc.M009606200.
- [234] E. Unger, I. Pettersson, U.J. Eriksson, U. Lindahl, L. Kjellen, Decreased Activity of the Heparan Sulfate-modifying Enzyme Glucosamyl N-Deacetylase in Hepatocytes from Streptozotocin diabetic rats., *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 8671–8674.
- [235] A.L.W.M.M. Rops, J. van der Vlag, J.F.M. Lensen, T.J.M. Wijnhoven, L.P.W.J. van den Heuvel, T.H. van Kuppevelt, et al., Heparan sulfate proteoglycans in glomerular inflammation., *Kidney Int.* 65 (2004) 768–85. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00451.x.
- [236] J. Kreuger, S. Dorothe, J. Li, U. Lindahl, Interactions between heparan sulfate and proteins: the concept of specificity, *J. Cell Biol.* 174 (2006) 323–327. doi:10.1083/jcb.200604035.
- [237] U. Lindahl, J. Li, Chapter 3 Interactions Between Heparan Sulfate and Proteins—Design and Functional Implications, *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 276 (2009) 105–159.
- [238] M. a Skidmore, S.E. Guimond, T.R. Rudd, D.G. Fernig, J.E. Turnbull, E. a Yates, The activities of heparan sulfate and its analogue heparin are dictated by biosynthesis, sequence, and conformation., *Connect. Tissue Res.* 49 (2008) 140–4. doi:10.1080/03008200802148595.
- [239] U. Häcker, K. Nybakken, N. Perrimon, Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (2005) 530–541. doi:10.1038/nrm1681.
- [240] R. V. Iozzo, J.D. San Antonio, Heparan sulfate proteoglycans: Heavy hitters in the angiogenesis arena, *J. Clin. Invest.* 108 (2001) 349–355. doi:10.1172/JCI200113738.
- [241] A. Yoneda, M.E. Lendorf, J.R. Couchman, H. a B. Mulhaupt, Breast and ovarian

- cancers: a survey and possible roles for the cell surface heparan sulfate proteoglycans., *J. Histochem. Cytochem.* 60 (2012) 9–21. doi:10.1369/0022155411428469.
- [242] J. Filmus, M. Capurro, J. Rast, Glypicans, *Genome Biol.* 9 (2008) 224. doi:10.1186/gb-2008-9-5-224.
- [243] J. Kreuger, L. Perez, A.J. Giraldez, S.M. Cohen, Opposing activities of Dally-like glypican at high and low levels of wingless morphogen activity, *Dev. Cell.* 7 (2004) 503–512. doi:10.1016/j.devcel.2004.08.005.
- [244] A. Traister, W. Shi, J. Filmus, Mammalian Notum induces the release of glypicans and other GPI-anchored proteins from the cell surface., *Biochem. J.* 410 (2008) 503–11. doi:10.1042/BJ20070511.
- [245] C. Han, D. Yan, T.Y. Belenkaya, X. Lin, *Drosophila* glypicans Dally and Dally-like shape the extracellular Wingless morphogen gradient in the wing disc., *Development.* 132 (2005) 667–679. doi:10.1242/dev.01636.
- [246] C. Han, T.Y. Belenkaya, B. Wang, X. Lin, *Drosophila* glypicans control the cell-to-cell movement of Hedgehog by a dynamin-independent process., *Development.* 131 (2004) 601–11. doi:10.1242/dev.00958.
- [247] T.Y. Belenkaya, C. Han, D. Yan, R.J. Opoka, M. Khodoun, H. Liu, et al., *Drosophila* Dpp morphogen movement is independent of dynamin-mediated endocytosis but regulated by the glypican members of heparan sulfate proteoglycans, *Cell.* 119 (2004) 231–244. doi:10.1016/j.cell.2004.09.031.
- [248] T. Akiyama, K. Kamimura, C. Firkus, S. Takeo, O. Shimmi, H. Nakato, Dally regulates Dpp morphogen gradient formation by stabilizing Dpp on the cell surface, *Dev. Biol.* 313 (2008) 408–419. doi:10.1016/j.ydbio.2007.10.035.
- [249] C.A. Kirkpatrick, B.D. Dimitroff, J.M. Rawson, S.B. Selleck, Spatial regulation of wingless morphogen distribution and signaling by Dally-like protein, *Dev. Cell.* 7 (2004) 513–523. doi:10.1016/j.devcel.2004.08.004.
- [250] M.A. Stepp, S. Pal-Ghosh, G. Tadvalkar, A. Pajooresh-Ganji, Syndecan-1 and Its Expanding List of Contacts., *Adv. Wound Care.* 4 (2015) 235–249. doi:10.1089/wound.2014.0555.
- [251] J.R. Couchman, Syndecans: proteoglycan regulators of cell-surface microdomains?, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4 (2003) 926–937. doi:10.1038/nrm1257.
- [252] I.C. Dews, K.R. MacKenzie, Transmembrane domains of the syndecan family of growth factor coreceptors display a hierarchy of homotypic and heterotypic interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 20782–20787. doi:10.1073/pnas.0708909105.
- [253] Y. Choi, M.-J. Kwon, Y. Lim, J.-H. Yun, W. Lee, E.-S. Oh, Trans-regulation of Syndecan Functions by Hetero-oligomerization, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) jbc.M114.611798. doi:10.1074/jbc.M114.611798.
- [254] E.S. Oh, A. Woods, J.R. Couchman, Multimerization of the cytoplasmic domain of syndecan-4 is required for its ability to activate protein kinase C, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 11805–11811. doi:10.1074/jbc.272.18.11805.
- [255] T. Kinnunen, M. Kaksonen, J. Saarinen, N. Kalkkinen, H.B. Peng, H. Rauvala, Cortactin-Src Kinase Signaling Pathway Is Involved in N-syndecan-dependent Neurite Outgrowth, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 10702–10708. doi:10.1074/jbc.273.17.10702.
- [256] M.D. Bass, M.J. Humphries, Cytoplasmic interactions of syndecan-4 orchestrate adhesion receptor and growth factor receptor signalling., *Biochem. J.* 368 (2002) 1–15. doi:10.1042/BJ20021228.

- [257] H.A. Multhaupt, A. Yoneda, J.R. Whiteford, E.S. Oh, W. Lee, J.R. Couchman, Syndecan signaling: when, where and why?, *J. Physiol. Pharmacol.* 60 Suppl 4 (2009) 31–38.
- [258] K. Lambaerts, S. Van Dyck, E. Mortier, Y. Ivarsson, G. Degeest, a. Luyten, et al., Syntenin, a syndecan adaptor and an Arf6 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate effector, is essential for epiboly and gastrulation cell movements in zebrafish, *J. Cell Sci.* 125 (2012) 1129–1140. doi:10.1242/jcs.089987.
- [259] S. Maday, E. Anderson, H.C. Chang, J. Shorter, A. Satoh, H. Fölsch, et al., A PDZ-Binding Motif Controls Basolateral Targeting of Syndecan-1 Along the Biosynthetic Pathway in Polarized Epithelial Cells, *Traffic*. 9 (2008) 1–17. doi:10.1111/j.1600-0854.2008.00805.x.A.
- [260] B. Cheng, M. Montmasson, L. Terradot, P. Rousselle, Syndecans as Cell Surface Receptors in Cancer Biology. A Focus on their Interaction with PDZ Domain Proteins, *Front. Pharmacol.* 7 (2016) 1–9. doi:10.3389/fphar.2016.00010.
- [261] A. Linker, P. Hovingh, The heparitin sulfates (heparan sulfates), *Carbohydr. Res.* 29 (1973) 41–62.
- [262] U. Lindahl, K. Lidholt, D. Spillmann, L. Kjellen, More to “heparin” than anticoagulation, *Thromb. Res.* 75 (1994) 1–31.
- [263] J.J. Castellot, R. Hoover, P. Harper, M. Karnovsky, Heparin and Glomerular Epithelial Cell-Secreted Heparin like Species Inhibit Mesangial-Cell Proliferation, *Am. J. Pathol.* 120 (1985) 427–435.
- [264] N.S. Fedarko, M. Ishihara, E. Conrad, Control of Cell Division in Hepatoma Cells by Exogenous Heparan Sulfate Proteoglycan, *J. Cell. Physiol.* 294 (1989) 287–294.
- [265] N. Perrimon, M. Bernfield, Specificities of heparan sulphate proteoglycans in developmental processes., *Nature*. 404 (2000) 725–728. doi:10.1038/35008000.
- [266] J.A. Marcum, J.B. Mckenney, S.J. Galli, R.W. Jackman, R.D. Rosenberg, Anticoagulant active heparin-like from mast cell-deficient mice molecules, *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 250 (1986) H879–H888.
- [267] R. Sasisekharan, S. Ernst, G. Venkataraman, On the regulation of fibroblast growth factor activity by heparin-like glycosaminoglycans., *Angiogenesis*. 1 (1997) 45–54. doi:10.1023/A:1018318914258.
- [268] D. Shukla, J. Liu, P. Blaiklock, N.W. Shworak, X. Bai, J.D. Esko, et al., A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry., *Cell*. 99 (1999) 13–22. doi:10.1016/S0092-8674(00)80058-6.
- [269] Y. Chen, T. Maguire, R.E. Hileman, J.R. Fromm, J.D. Esko, R.J. Linhardt, et al., Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate, *Nat. Med.* 320 (1997) 866–871. doi:10.1038/nm0897-866.
- [270] M.M. Fuster, J.D. Esko, The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets., *Nat. Rev. Cancer*. 5 (2005) 526–542. doi:10.1038/nrc1649.
- [271] M. Ho, K. Heungnam, Glypican-3 : a new target for cancer immunotherapy, *Eur. J. Cancer*. 47 (2011) 333–338. doi:10.1016/j.ejca.2010.10.024.Glypican-3.
- [272] M.I. Capurro, W. Shi, S. Sandal, J. Filmus, Processing by convertases is not required for glypican-3-induced stimulation of hepatocellular carcinoma growth., *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 41201–6. doi:10.1074/jbc.M507004200.
- [273] H.-C. Hsu, W. Cheng, P.-L. Lai, Cloning and Expression of a Developmentally Regulated Transcript MXR7 in Hepatocellular Carcinoma: Biological Significance and Temporospacial Distribution, *Cancer Res.* 57 (1997) 5179–5184.

- [274] T. Ishiguro, M. Sugimoto, Y. Kinoshita, Y. Miyazaki, K. Nakano, H. Tsunoda, et al., Anti-glypican 3 antibody as a potential antitumor agent for human liver cancer., *Cancer Res.* 68 (2008) 9832–8. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-1973.
- [275] K. Nakano, T. Orita, J. Nezu, T. Yoshino, I. Ohizumi, M. Sugimoto, et al., Anti-glypican 3 antibodies cause ADCC against human hepatocellular carcinoma cells., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 378 (2009) 279–84. doi:10.1016/j.bbrc.2008.11.033.
- [276] S. Grisaru, D. Cano-Gauci, J. Tee, J. Filmus, N.D. Rosenblum, Glypican-3 modulates BMP- and FGF-mediated effects during renal branching morphogenesis., *Dev. Biol.* 231 (2001) 31–46. doi:10.1006/dbio.2000.0127.
- [277] Y.K. Sung, S.Y. Hwang, F. Mohammad, J.-C. Kim, M.K. Kim, Growth promotion of HepG2 hepatoma cells by antisense-mediated knockdown of glypican-3 is independent of insulin-like growth factor 2 signaling, *Exp. Mol. Med.* 35 (2003) 257–262.
- [278] Y. Xiang, V. Ladeda, J. Filmus, Glypican-3 expression is silenced in human breast cancer, *Oncogene.* 20 (2001) 7408–7412.
- [279] G. Su, K. Meyer, C.D. Nandini, D. Qiao, S. Salamat, A. Friedl, Glypican-1 is frequently overexpressed in human gliomas and enhances FGF-2 signaling in glioma cells., *Am. J. Pathol.* 168 (2006) 2014–26. doi:10.2353/ajpath.2006.050800.
- [280] K. Matsuda, H. Maruyama, F. Guo, J. Itakura, Y. Matsumoto, A.D. Lander, et al., Glypican-1 Is Overexpressed in Human Breast Cancer and Modulates the Mitogenic Effects of Multiple Heparin-binding Growth Factors in Breast Cancer Cells 1, *Cancer Res.* 61 (2001) 5562–5569.
- [281] J. Kleeff, T. Ishiwata, A. Kumbasar, H. Friess, M.W. Büchler, A.D. Lander, et al., The cell-surface heparan sulfate proteoglycan glypican-1 regulates growth factor action in pancreatic carcinoma cells and is overexpressed in human pancreatic cancer, *J. Clin. Invest.* 102 (1998) 1662–1673. doi:10.1172/JCI4105.
- [282] D. Williamson, J. Selfe, T. Gordon, Y.-J. Lu, K. Pritchard-Jones, K. Murai, et al., Role for amplification and expression of glypican-5 in rhabdomyosarcoma., *Cancer Res.* 67 (2007) 57–65. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1650.
- [283] D.A. Pye, R.R. Vives, J.E. Turnbull, P. Hyde, J.T. Gallagher, Heparan Sulfate Oligosaccharides Require 6-O-Sulfation for Promotion of Basic Fibroblast Growth Factor Mitogenic Activity, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 22936–22942.
- [284] J.R. Bishop, M. Schuksz, J.D. Esko, Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology., *Nature.* 446 (2007) 1030–7. doi:10.1038/nature05817.
- [285] J. Filmus, Glypicans in growth control and cancer., *Glycobiology.* 11 (2001) 19R–23R. doi:10.1093/glycob/11.3.19R.
- [286] D. Beauvais, B. Ell, A. McWhorter, A. Rapraeger, Syndecan-1 regulates  $\alpha 3$  and  $\alpha 5$  integrin activation during angiogenesis and is blocked by synstatin, a novel peptide inhibitor, *J. Exp. Med.* 206 (2009) 691–705. doi:10.1084/jem.20081278.
- [287] M.R. Morgan, M.J. Humphries, M.D. Bass, Synergistic control of cell adhesion by integrins and syndecans., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 957–69. doi:10.1038/nrm2289.
- [288] A.C. Rapraeger, Synstatin: a selective inhibitor of the syndecan-1-coupled IGF1R- $\alpha\beta 3$  integrin complex in tumorigenesis and angiogenesis, *FEBS Lett.* 280 (2003) 2207–2215. doi:10.1111/febs.12160.Synstatin.
- [289] P. Zimmermann, G. David, The syndecans, tuners of transmembrane signaling., *FASEB J.* 13 Suppl (1999) S91–S100. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10352150>.

- [290] A.N. Alexopoulou, H.A.B. Multhaupt, J.R. Couchman, Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39 (2007) 505–528. doi:10.1016/j.biocel.2006.10.014.
- [291] F. Granés, R. García, R.P. Casaroli-Marano, S. Castel, N. Rocamora, M. Reina, et al., Syndecan-2 induces filopodia by active cdc42Hs., *Exp. Cell Res.* 248 (1999) 439–56. doi:10.1006/Excr.1999.4437.
- [292] C. Berndt, E. Montañez, J. Villena, M. Fabre, S. Vilaró, M. Reina, Influence of cytoplasmic deletions on the filopodia-inducing effect of syndecan-3, *Cell Biol. Int.* 28 (2004) 829–833. doi:10.1016/j.cellbi.2004.08.003.
- [293] M.F. Baietti, Z. Zhang, E. Mortier, A. Melchior, G. Degeest, A. Geeraerts, et al., Syndecan–syntenin–ALIX regulates the biogenesis of exosomes, *Nat. Cell Biol.* 14 (2012) 677–685. doi:10.1038/ncb2502.
- [294] V. Friand, G. David, P. Zimmermann, Syntenin and syndecan in the biogenesis of exosomes, *Biol. Cell.* 107 (2015) 331–341. doi:10.1111/boc.201500010.
- [295] C.K. Wang, L. Pan, J. Chen, M. Zhang, Extensions of PDZ domains as important structural and functional elements, *Protein Cell.* 1 (2010) 737–751. doi:10.1007/s13238-010-0099-6.
- [296] J.J. Grootjans, G. Reekmans, H. Ceulemans, G. David, Syntenin-syndecan binding requires syndecan-syntenin and the co-operation of both PDZ domains of syntenin, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 19933–19941. doi:10.1074/jbc.M002459200.
- [297] T. Manon-Jensen, Y. Itoh, J.R. Couchman, Proteoglycans in health and disease: The multiple roles of syndecan shedding, *FEBS J.* 277 (2010) 3876–3889. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07798.x.
- [298] U. Brockstedt, Immunoreactivity to Cell Surface Syndecans in Cytoplasm and Nucleus: Tubulin-Dependent Rearrangements, *Exp. Cell Res.* 274 (2002) 235–245. doi:10.1006/excr.2002.5477.
- [299] I. Kovalszky, A. Hjerpe, K. Dobra, Nuclear translocation of heparan sulfate proteoglycans and their functional significance., *Biochim. Biophys. Acta.* 1840 (2014) 2491–2497. doi:10.1016/j.bbagen.2014.04.015.
- [300] K. a Mislick, J.D. Baldeschwieler, Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 12349–54. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=37994&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [301] C.K. Payne, S.A. Jones, C. Chen, X. Zhuang, Internalization and Trafficking of Cell Surface Proteoglycans and Proteoglycan-Binding Ligands, *Traffic.* 8 (2007) 389–401. doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00540.x.Internalization.
- [302] B.C. Thompson, C.R.J. Segarra, O.L. Mozley, O. Daramola, R. Field, P.R. Levison, et al., Cell line specific control of polyethylenimine-mediated transient transfection optimized with “Design of experiments” methodology., *Biotechnol. Prog.* 28 (2012) 179–87. doi:10.1002/btpr.715.
- [303] Z.U. Rehman, K. a. Sjollem, J. Kuipers, D. Hoekstra, I.S. Zuhorn, Nonviral gene delivery vectors use syndecan-dependent transport mechanisms in filopodia to reach the cell surface, *ACS Nano.* 6 (2012) 7521–7532. doi:10.1021/nn3028562.
- [304] A.W. Wong, T.K. Baginski, D.E. Reilly, Enhancement of DNA uptake in FUT8-deleted CHO cells for transient production of afucosylated antibodies., *Biotechnol. Bioeng.* 106 (2010) 751–63. doi:10.1002/bit.22749.

- [305] I. Kopatz, J.-S. Remy, J.-P. Behr, A model for non-viral gene delivery: through syndecan adhesion molecules and powered by actin., *J. Gene Med.* 6 (2004) 769–76. doi:10.1002/jgm.558.
- [306] D. Sprouse, T.M. Reineke, Investigating the effects of Block versus Statistical Glycopolycations Containing Primary and Tertiary Amines for Plasmid DNA Delivery, *Biomacromolecules*. 15 (2014) 2616–2628.
- [307] L.C. Mounkes, W. Zhong, G. Cipres-Palacin, T.D. Heath, R.J. Debs, Proteoglycans mediate cationic liposome-DNA complex-based gene delivery in vitro and in vivo., *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 26164–70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9748298>.
- [308] S. Paris, A. Burlacu, Y. Durocher, Opposing roles of syndecan-1 and syndecan-2 in polyethyleneimine-mediated gene delivery., *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 7697–704. doi:10.1074/jbc.M705424200.
- [309] M. Ruponen, S. Rönkkö, P. Honkakoski, J. Pelkonen, M. Tammi, a Urtti, Extracellular glycosaminoglycans modify cellular trafficking of lipoplexes and polyplexes., *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 33875–80. doi:10.1074/jbc.M011553200.
- [310] M. Ruponen, P. Honkakoski, M. Tammi, A. Urtti, Cell-surface glycosaminoglycans inhibit cation-mediated gene transfer., *J. Gene Med.* 6 (2004) 405–14. doi:10.1002/jgm.522.
- [311] I. V Fuki, M.E. Meyer, K.J. Williams, Transmembrane and cytoplasmic domains of syndecan mediate a multi-step endocytic pathway involving detergent-insoluble membrane rafts., *Biochem. J.* 351 Pt 3 (2000) 607–12. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1221399&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [312] I. V Fuki, K.M. Kuhn, I.R. Lomazov, V.L. Rothman, G.P. Tuszyński, R. V Iozzo, et al., The syndecan family of proteoglycans. Novel receptors mediating internalization of atherogenic lipoproteins in vitro., *J. Clin. Invest.* 100 (1997) 1611–22. doi:10.1172/JCI119685.
- [313] F. Zong, E. Fthenou, N. Wolmer, P. Hollósi, I. Kovalszky, L. Szilák, et al., Syndecan-1 and FGF-2, but Not FGF Receptor-1, Share a Common Transport Route and Co-Localize with Heparanase in the Nuclei of Mesenchymal Tumor Cells, *PLoS One*. 4 (2009) e7346. doi:10.1371/journal.pone.0007346.
- [314] K. Chen, K.J. Williams, Molecular Mediators for Raft-dependent Endocytosis of Syndecan-1, a Highly Conserved, Multifunctional Receptor, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 13988–13999. doi:10.1074/jbc.M112.444737.
- [315] Z. Ziraksaz, A. Nomani, M. Ruponen, M. Soleimani, M. Tabbakhian, I. Haririan, Cell-surface glycosaminoglycans inhibit intranuclear uptake but promote post-nuclear processes of polyamidoamine dendrimer-pDNA transfection, *Eur. J. Pharm. Sci.* 48 (2013) 55–63. doi:10.1016/j.ejps.2012.10.016.
- [316] P.M. McLendon, D.J. Buckwalter, E.M. Davis, T.M. Reineke, Interaction of poly(glycoamidoamine) DNA delivery vehicles with cell-surface glycosaminoglycans leads to polyplex internalization in a manner not solely dependent on charge, *Mol. Pharm.* 7 (2010) 1757–1768. doi:10.1021/mp100135n.
- [317] S. Geisse, C. Fux, Recombinant protein production by transient gene transfer into mammalian cells., *Methods Enzymol.* 463 (2009) 223–38. doi:10.1016/S0076-6879(09)63015-9.
- [318] L. Baldi, D.L. Hacker, M. Adam, F.M. Wurm, Recombinant protein production by large-

- scale transient gene expression in mammalian cells: State of the art and future perspectives, *Biotechnol. Lett.* 29 (2007) 677–684. doi:10.1007/s10529-006-9297-y.
- [319] P. Chahal, Y. Durocher, A. Kamen, Cell Transfection, in: M.B.T.-C.B. (Second E. Moo-Young (Ed.), Academic Press, Burlington, 2011: pp. 395–401. doi:http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00042-8.
- [320] L. Aravindan, K. a Bicknell, G. Brooks, V. V Khutoryanskiy, A.C. Williams, Effect of acyl chain length on transfection efficiency and toxicity of polyethylenimine., *Int. J. Pharm.* 378 (2009) 201–10. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.05.052.
- [321] S. Nimesh, A. Aggarwal, P. Kumar, Y. Singh, K.C. Gupta, R. Chandra, Influence of acyl chain length on transfection mediated by acylated PEI nanoparticles., *Int. J. Pharm.* 337 (2007) 265–74. doi:10.1016/j.ijpharm.2006.12.032.
- [322] Y. Durocher, S. Perret, A. Kamen, High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) 1–9.
- [323] J. Xiang, J. Roder, N. Hozumi, Anti-tag72 of murine V-human Crl chimeric antibody using V region cDNA amplified by PCR, *Mol. Immunol.* 27 (1990) 809–817.
- [324] B. Massie, D.D. Mosser, M. Koutroumanis, I. Vitté-Mony, L. Lamoureux, F. Couture, et al., New adenovirus vectors for protein production and gene transfer., *Cytotechnology.* 28 (1998) 53–64. doi:10.1023/A:1008013211222.
- [325] Y. Durocher, S. Perret, E. Thibaudeau, M.H. Gaumond, a Kamen, R. Stocco, et al., A reporter gene assay for high-throughput screening of G-protein-coupled receptors stably or transiently expressed in HEK293 EBNA cells grown in suspension culture., *Anal. Biochem.* 284 (2000) 316–26. doi:10.1006/abio.2000.4698.
- [326] T.-L. Hwang, A.J. Shaka, Water Suppression That Works. Excitation Sculpting Using Arbitrary Wave-Forms and Pulsed-Field Gradients, *J. Magn. Reson. Series A* 1 (1995) 275–279.
- [327] W. Willker, D. Leibfritz, R. Kerssebaum, W. Bermel, Gradient Selection in Inverse Heteronuclear Correlation Spectroscopy, *Magn. Reson. Chem.* 31 (1993) 287–292.
- [328] L. Li, J. Qin, Q. Feng, H. Tang, R. Liu, L. Xu, et al., Heparin promotes suspension adaptation process of CHO-TS28 cells by eliminating cell aggregation., *Mol. Biotechnol.* 47 (2011) 9–17. doi:10.1007/s12033-010-9306-1.
- [329] S.R. Eberhardy, L. Radzniak, Z. Liu, Iron (III) citrate inhibits polyethylenimine-mediated transient transfection of Chinese hamster ovary cells in serum-free medium., *Cytotechnology.* (2009). doi:10.1007/s10616-009-9198-8.
- [330] C. Raymond, R. Tom, S. Perret, P. Moussouami, D. L’Abbé, G. St-Laurent, et al., A simplified polyethylenimine-mediated transfection process for large-scale and high-throughput applications., *Methods.* 55 (2011) 44–51. doi:10.1016/j.ymeth.2011.04.002.
- [331] R.S. Burke, S.H. Pun, Extracellular barriers to in Vivo PEI and PEGylated PEI polyplex-mediated gene delivery to the liver., *Bioconjug. Chem.* 19 (2008) 693–704. doi:10.1021/bc700388u.
- [332] J.D. Loike, S.C. Silverstein, A fluorescence quenching technique using trypan blue to differentiate between attached and ingested glutaraldehyde-fixed red blood cells in phagocytosing murine macrophages., *J. Immunol. Methods.* 57 (1983) 373–9. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6402550.
- [333] W. Wang, W. Li, N. Ma, G. Steinhoff, Non-viral gene delivery methods., *Curr. Pharm. Biotechnol.* 14 (2013) 46–60.



<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3689559&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- [334] M.-S. Cho, H. Yee, C. Brown, B. Mei, C. Mirenda, S. Chan, Versatile expression system for rapid and stable production of recombinant proteins., *Biotechnol. Prog.* 19 (2003) 229–32. doi:10.1021/bp0255964.
- [335] L. Delafosse, P. Xu, Y. Durocher, Physicochemical properties of LPEI 25 kDa, PEI“Max” 40 kDa and PEIpro™ - Data in Brief submitted, *J. Biotechnol.* (2016).
- [336] Z. Garaiova, S.P. Strand, N.K. Reitan, S. L  lu, S.  . St  rset, K. Berg, et al., Cellular uptake of DNA-chitosan nanoparticles: the role of clathrin- and caveolae-mediated pathways., *Int. J. Biol. Macromol.* 51 (2012) 1043–51. doi:10.1016/j.ijbiomac.2012.08.016.
- [337] R. Gilbert, S. Brousseau, B. Massie, Chapter 14: Protein production using lentiviral vectors, in: *Expr. Syst. Methods Express*, M.R. Dyson, Scion Publishing Limited, 2007: pp. 241–259.
- [338] S. Wulhfard, L. Baldi, D.L. Hacker, F. Wurm, Valproic acid enhances recombinant mRNA and protein levels in transiently transfected Chinese hamster ovary cells, *J. Biotechnol.* 148 (2010) 128–132. doi:10.1016/j.jbiotec.2010.05.003.
- [339] Y. Durocher, M. Loignon, Use of protein kinase B and valproic acid to increase heterologous gene expression in mammalian cells, EP2285969 B1, 2009.
- [340] S. Noel, B. Liberelle, L. Robitaille, G. De Crescenzo, Quantification of primary amine groups available for subsequent biofunctionalization of polymer surfaces, *Bioconjug. Chem.* 22 (2011) 1690–1699. doi:10.1021/bc200259c.
- [341] D.J. Glover, H.J. Lipps, D. a Jans, Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans., *Nat. Rev. Genet.* 6 (2005) 299–310. doi:10.1038/nrg1577.
- [342] S. Chira, C.S. Jackson, I. Oprea, F. Ozturk, M.S. Pepper, I. Diaconu, et al., Progresses towards safe and efficient gene therapy vectors, *Oncotarget.* 6 (2015) 30675–30703.
- [343] U. Lungwitz, M. Breunig, T. Blunk, a G  pferich, Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems., *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 60 (2005) 247–66. doi:10.1016/j.ejpb.2004.11.011.
- [344] M. Thomas, a. M. Klivanov, Non-viral gene therapy: Polycation-mediated DNA delivery, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62 (2003) 27–34. doi:10.1007/s00253-003-1321-8.
- [345] P. Neuberg, A. Kichler, Recent developments in nucleic acid delivery with polyethylenimines., *Adv. Genet.* 88 (2014) 263–88. doi:10.1016/B978-0-12-800148-6.00009-2.
- [346] M. Breunig, U. Lungwitz, R. Liebl, C. Fontanari, J. Klar, A. Kurtz, et al., Gene delivery with low molecular weight linear polyethylenimines., *J. Gene Med.* 7 (2005) 1287–98. doi:10.1002/jgm.775.
- [347] D. Goula, C. Benoist, S. Mantero, G. Merlo, G. Levi, B. a Demeneix, Polyethylenimine-based intravenous delivery of transgenes to mouse lung., *Gene Ther.* 5 (1998) 1291–5. doi:10.1038/sj.gt.3300717.
- [348] M. Thomas, Q. Ge, J.J. Lu, J. Chen, A.M. Klivanov, Cross-linked Small Polyethylenimines: While Still Nontoxic, Deliver DNA Efficiently to Mammalian Cells in Vitro and in Vivo, *Phar.* 22 (2005) 373–380. doi:10.1007/s11095-004-1874-y.
- [349] X. Li, Z. Xie, C. Xie, W. Lu, C. Gao, H. Ren, et al., D-SP5 Peptide-Modified Highly Branched Polyethylenimine for Gene Therapy of Gastric Adenocarcinoma, *Bioconjug.*

- Chem. 26 (2015) 1494–1503. doi:10.1021/acs.bioconjchem.5b00137.
- [350] S. Grosse, G. Thevenot, M. Monsigny, I. Fajac, Which mechanism for nuclear import of plasmid DNA complexed with polyethylenimine derivatives?, *J. Gene Med.* (2006) 845–851. doi:10.1002/jgm.
  - [351] J.D. Larsen, N.L. Ross, M.O. Sullivan, Requirements for the nuclear entry of polyplexes and nanoparticles during mitosis, *J. Gene Med.* 14 (2012) 580–589. doi:10.1002/jgm.
  - [352] Y. Choi, H. Chung, H. Jung, J.R. Couchman, E.S. Oh, Syndecans as cell surface receptors: Unique structure equates with functional diversity, *Matrix Biol.* 30 (2011) 93–99. doi:10.1016/j.matbio.2010.10.006.
  - [353] M.E. Favretto, R. Wallbrecher, S. Schmidt, R. Van De Putte, R. Brock, Glycosaminoglycans in the cellular uptake of drug delivery vectors - Bystanders or active players?, *J. Control. Release.* 180 (2014) 81–90. doi:10.1016/j.jconrel.2014.02.011.
  - [354] W. Hua, D. Sheff, D. Toomre, I. Mellman, Vectorial insertion of apical and basolateral membrane proteins in polarized epithelial cells revealed by quantitative 3D live cell imaging, *J. Cell Biol.* 172 (2006) 1035–1044. doi:10.1083/jcb.200512012.
  - [355] R.E. Campbell, O. Tour, A.E. Palmer, P. a Steinbach, G.S. Baird, D. a Zacharias, et al., A monomeric red fluorescent protein., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 7877–82. doi:10.1073/pnas.082243699.
  - [356] A. Choudhury, M. Dominguez, V. Puri, D.K. Sharma, K. Narita, C.L. Wheatley, et al., Rab proteins mediate Golgi transport of caveola-internalized glycosphingolipids and correct lipid trafficking in Niemann-Pick C cells, *J. Clin. Invest.* 109 (2002) 1541–1550. doi:10.1172/JCI200215420.
  - [357] P.L. Pham, S. Perret, B. Cass, E. Carpentier, G. St-Laurent, L. Bisson, et al., Transient gene expression in HEK293 cells: peptone addition posttransfection improves recombinant protein synthesis., *Biotechnol. Bioeng.* 90 (2005) 332–44. doi:10.1002/bit.20428.
  - [358] S. Ito, M. Karnovsky, Formaldehyde–glutaraldehyde fixatives containing trinitro compounds, *J. Cell Biol.* 39 (1968) 168–169.
  - [359] N.P. Gabrielson, D.W. Pack, Efficient polyethylenimine-mediated gene delivery proceeds via a caveolar pathway in HeLa cells., *J. Control. Release.* 136 (2009) 54–61. doi:10.1016/j.jconrel.2009.02.003.
  - [360] U. Klein, G. Gimpl, F. Fahrenholz, Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with  $\beta$ -cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor, *Biochemistry.* 34 (1995) 13784–13793.
  - [361] B.J. Nichols, A.K. Kenworthy, R.S. Polishchuk, R. Lodge, T.H. Roberts, K. Hirschberg, et al., Rapid cycling of lipid raft markers between the cell surface and golgi complex, *J. Cell Biol.* 152 (2001) 529–541. doi:10.1083/jcb.153.3.529.
  - [362] S.H. Hansen, K. Sandvig, B. van Deurs, Clathrin and HA2 adaptors: effects of potassium depletion, hypertonic medium, and cytosol acidification., *J. Cell Biol.* 121 (1993) 61–72. doi:10.1083/jcb.121.1.61.
  - [363] J.S. Humphrey, P.J. Peters, L.C. Yuan, J.S. Bonifacina, Localization of TGN38 to the trans-Golgi Network: Involvement of a Cytoplasmic Tyrosine-containing Sequence, *J. Cell Biol.* 120 (1993) 1123–1135.
  - [364] I. Jordens, M. Marsman, C. Kuijl, J. Neefjes, Rab Proteins, Connecting Transport and Vesicle Fusion, *Traffic.* 6 (2005) 1070–1077. doi:10.1111/j.1600-0854.2005.00336.x.
  - [365] M.E. Hwang, R.K. Keswani, D.W. Pack, Dependence of PEI and PAMAM Gene

- Delivery on Clathrin- and Caveolin-Dependent Trafficking Pathways, *Pharm. Res.* 32 (2014) 2051–2059. doi:10.1007/s11095-014-1598-6.
- [366] E. Tkachenko, M. Simons, Clustering Induces Redistribution of Syndecan-4 Core Protein into Raft Membrane Domains, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 19946–19951. doi:10.1074/jbc.M200841200.
- [367] C. Gonçalves, E. Mennesson, R. Fuchs, J.-P. Gorvel, P. Midoux, C. Pichon, Macropinocytosis of Polyplexes and Recycling of Plasmid via the Clathrin-Dependent Pathway Impair the Transfection Efficiency of Human Hepatocarcinoma Cells\*1, *Mol. Ther.* 10 (2004) 373–385. doi:10.1016/j.ymthe.2004.05.023.
- [368] F.R. Maxfield, T.E. McGraw, Endocytic recycling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5 (2004) 121–132. doi:10.1038/nrm1315.
- [369] N.L. Ross, E. V Munsell, C. Sabanayagam, M.O. Sullivan, Histone-targeted Polyplexes Avoid Endosomal Escape and Enter the Nucleus During Postmitotic Redistribution of ER Membranes, *Mol. Ther. Acids.* 4 (2015) e226. doi:10.1038/mtna.2015.2.
- [370] M. Reilly, J. Larsen, S. MO, Polyplexes traffic through caveolae to the Golgi and endoplasmic reticulum en route to the nucleus., *Mol. Pharm.* 9 (2012) 1280–1290.
- [371] C.M. Wiethoff, C.R. Middaugh, Barriers to nonviral gene delivery., *J. Pharm. Sci.* 92 (2003) 203–17. doi:10.1002/jps.10286.
- [372] M. Derouazi, P. Girard, F. Van Tilborgh, K. Iglesias, N. Muller, M. Bertschinger, et al., Serum-free large-scale transient transfection of CHO cells., *Biotechnol. Bioeng.* 87 (2004) 537–45. doi:10.1002/bit.20161.
- [373] P.L. Pham, S. Perret, H.C. Doan, B. Cass, G. St-Laurent, A. Kamen, et al., Large-scale transient transfection of serum-free suspension-growing HEK293 EBNA1 cells: peptone additives improve cell growth and transfection efficiency., *Biotechnol. Bioeng.* 84 (2003) 332–42. doi:10.1002/bit.10774.
- [374] Y. Zhang, A. Satterlee, L. Huang, In vivo gene delivery by nonviral vectors: overcoming hurdles?, *Mol. Ther.* 20 (2012) 1298–304. doi:10.1038/mt.2012.79.
- [375] R. V Iozzo, Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 (2005) 646–56. doi:10.1038/nrm1702.
- [376] F. Safaiyan, S.O. Kolset, K. Prydz, E. Gottfridsson, U. Lindahl, M. Salmivirta, Selective effects of sodium chlorate treatment on the sulfation of heparan sulfate., *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 36267–73. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10593915>.
- [377] T.H. Van Kuppevelt, M.A.B.A. Dennissen, W.J. Van Venrooij, R.M.A. Hoet, J.H. Veerkamp, Generation and application of type-specific Anti-Heparan sulfate antibodies using phage display technology, *Biochemistry.* 273 (1998) 12960 –12966.
- [378] M.A.B.A. Dennissen, G.J. Jenniskens, M. Pieffers, E.M.M. Versteeg, M. Petitou, J.H. Veerkamp, et al., Large, tissue-regulated domain diversity of heparan sulfates demonstrated by phage display antibodies, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 10982–10986. doi:10.1074/jbc.M104852200.
- [379] G. David, X.M. Bai, B. Vanderschueren, J.J. Cassiman, H. Vandenberghe, Developmental Changes in Heparan Sulfate Expression - Insitu Detection with mAbs, *J. Cell Biol.* 119 (1992) 961–975.
- [380] J. Van Den Born, K. Salmivirta, T. Henttinen, N. ??stman, T. Ishimaru, S. Miyaura, et al., Novel heparan sulfate structures revealed by monoclonal antibodies, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 20516–20523. doi:10.1074/jbc.M502065200.
- [381] M. Belting, P. Petersson, Protective role for proteoglycans against cationic lipid

- cytotoxicity allowing optimal transfection efficiency in vitro., *Biochem. J.* 342 ( Pt 2 (1999) 281–6.  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1220462&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [382] M. Kalia, V. Chandra, S.A. Rahman, D. Sehgal, S. Jameel, Heparan sulfate proteoglycans are required for cellular binding of the hepatitis E virus ORF2 capsid protein and for viral infection., *J. Virol.* 83 (2009) 12714–24. doi:10.1128/JVI.00717-09.
  - [383] C.M. Wiethoff, J.G. Smith, G.S. Koe, C.R. Middaugh, The potential role of proteoglycans in cationic lipid-mediated gene delivery. Studies of the interaction of cationic lipid-DNA complexes with model glycosaminoglycans., *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 32806–13. doi:10.1074/jbc.M007940200.
  - [384] G. David, M. Bernfield, The Emerging Roles of Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans, *Matrix Biol.* 17 (1998) 461–463.
  - [385] M. Belting, Heparan sulfate proteoglycan as a plasma membrane carrier, *Trends Biochem. Sci.* 28 (2003) 145–151. doi:10.1016/S0968-0004(03)00031-8.
  - [386] M. Bernfield, M. Gotte, P.W. Park, O. Reizes, M.L. Fitzgerald, J. Lincecum, et al., Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans., *Annu. Rev. Biochem.* 68 (1999) 729–777.
  - [387] C.K.M. Tripathi, J. Banga, V. Mishra, Microbial heparin/heparan sulphate lyases: Potential and applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94 (2012) 307–321. doi:10.1007/s00253-012-3967-6.
  - [388] T. Letoha, K. Csongor, É. Csaba, K. Anikó, K. Erzsébet, S. Gerda, et al., Contribution of syndecans to lipoplex-mediated gene delivery, *Eur. J. Pharm. Sci.* (2013) 1–6.
  - [389] T. Letoha, A. Keller-Pintérc, E. Kusza, C. Kolozsia, Z. Bozsód, G. Tóthd, et al., Cell-penetrating peptide exploited syndecans, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1798 (2010) 2258–2265.
  - [390] A. Orellana, C.B. Hirschberg, Z. Wei, S.J. Swiedler, M. Ishihara, Molecular cloning and expression of a glycosaminoglycan N-acetylglucosaminyl N-deacetylase/N-sulfotransferase from a heparin-producing cell line, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 2270–2276.
  - [391] H. Habuchi, O. Habuchi, K. Kimata, Purification and characterization of heparan sulfate 6-sulfotransferase from the culture medium of Chinese hamster ovary cells, *J. Biochem. Chem.* 270 (1995) 4172–4179.
  - [392] M. Kobayashi, H. Habuchi, O. Habuchi, M. Saito, K. Kimata, Purification and characterization of heparan sulfate 2-sulfotransferase from cultured Chinese hamster ovary cells., *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 7645–7653. doi:10.1074/jbc.271.13.7645.
  - [393] S. Sarrazin, W.C. Lamanna, J.D. Esko, Heparan sulfate proteoglycans, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3 (2011) 1–33. doi:10.1101/cshperspect.a004952.
  - [394] G.T. Hessa, W. Humphries IV, N. Fayb, C.K. Payne, Cellular Binding, Motion, and Internalization of Synthetic Gene Delivery Polymers, *Biochim Biophys Acta.* 1773 (2007) 1583–1588.
  - [395] A. Fico, F. Maina, R. Dono, Fine-tuning of cell signaling by glypicans, *Cell. Mol. Life Sci.* 68 (2011) 923–929. doi:10.1007/s00018-007-7471-6.
  - [396] C. Ortmann, U. Pickhinke, S. Exner, S. Ohlig, R. Lawrence, H. Jboor, et al., Sonic hedgehog processing and release are regulated by glypican heparan sulfate proteoglycans, *J. Cell Sci.* 128 (2015) 2374–2385. doi:10.1242/jcs.170670.

- [397] H.H. Song, W. Shi, Y.Y. Xiang, J. Filmus, The loss of glypican-3 induces alterations in Wnt signaling, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 2116–2125. doi:10.1074/jbc.M410090200.
- [398] S.C. Desbordes, B. Sanson, The glypican Dally-like is required for Hedgehog signalling in the embryonic epidermis of *Drosophila*., *Development*. 130 (2003) 6245–55. doi:10.1242/dev.00874.
- [399] I. Strate, F. Tessadori, J. Bakkers, Glypican4 promotes cardiac specification and differentiation by attenuating canonical Wnt and Bmp signaling., *Development*. 142 (2015) 1767–76. doi:10.1242/dev.113894.
- [400] M.I. Capurro, P. Xu, W. Shi, F. Li, A. Jia, J. Filmus, Glypican-3 Inhibits Hedgehog Signaling during Development by Competing with Patched for Hedgehog Binding, *Dev. Cell*. 14 (2008) 700–711. doi:10.1016/j.devcel.2008.03.006.
- [401] M. Belting, K. Mani, M. Jönsson, F. Cheng, S. Sandgren, S. Jonsson, et al., Glypican-1 is a vehicle for polyamine uptake in mammalian cells: a pivotal role for nitrosothiol-derived nitric oxide., *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 47181–9. doi:10.1074/jbc.M308325200.
- [402] A. Mullick, Y. Xu, R. Warren, M. Koutroumanis, C. Guilbault, S. Broussau, et al., The cumate gene-switch: a system for regulated expression in mammalian cells., *BMC Biotechnol.* 6 (2006) 43. doi:10.1186/1472-6750-6-43.
- [403] J.R. Birch, A.J. Racher, Antibody production, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58 (2006) 671–685. doi:10.1016/j.addr.2005.12.006.
- [404] A.M. Krieg, CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects, *Annu. Rev. Immunol.* 20 (2002) 709–760. doi:10.1146/annurev.immunol.20.100301.064842.
- [405] N. Borth, Opening the black box : Chinese hamster ovary research goes genome scale, *Pharm. Bioprocess.* 2 (2014) 367–369. doi:10.4155/pbp.14.42.
- [406] C.S. Kaas, C. Kristensen, M.J. Betenbaugh, M.R. Andersen, Sequencing the CHO DXB11 genome reveals regional variations in genomic stability and haploidy., *BMC Genomics*. 16 (2015) 160. doi:10.1186/s12864-015-1391-x.
- [407] P. Datta, G. Li, B. Yang, X. Zhao, J.Y. Baik, T.R. Gemmill, et al., Bioengineered chinese hamster ovary cells with golgi-targeted 3-O-sulfotransferase-1 biosynthesize heparan sulfate with an antithrombin-binding site, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 37308–37318. doi:10.1074/jbc.M113.519033.
- [408] F.M. Wurm, D. Hacker, First CHO genome., *Nat. Biotechnol.* 29 (2011) 718–20. doi:10.1038/nbt.1943.
- [409] F. Wurm, CHO Quasispecies—Implications for Manufacturing Processes, *Processes*. 1 (2013) 296–311. doi:10.3390/pr1030296.
- [410] H.C. Christianson, M. Belting, Heparan sulfate proteoglycan as a cell-surface endocytosis receptor., *Matrix Biol.* (2013). doi:10.1016/j.matbio.2013.10.004.
- [411] S. Bacsa, G. Karasneh, S. Dosa, J. Liu, T. Valyi-Nagy, D. Shukla, Syndecan-1 and syndecan-2 play key roles in herpes simplex virus type-1 infection., *J. Gen. Virol.* 92 (2011) 733–43. doi:10.1099/vir.0.027052-0.
- [412] L. de Witte, M. Bobardt, U. Chatterji, G. Degeest, G. David, T.B.H. Geijtenbeek, et al., Syndecan-3 is a dendritic cell-specific attachment receptor for HIV-1., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 19464–19469. doi:10.1073/pnas.0703747104.
- [413] M. Sapp, M. Bienkowska-Haba, Viral entry mechanisms: Human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus, *FEBS J.* 276 (2009) 7206–7216. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07400.x.

## **Annexe 1 : Prix et Bourses Obtenus durant la Thèse**

2011 : Bourse de recrutement Pierre Eude Saindon.

2012 : Bourse d'excellence de la faculté des études supérieures de l'Université de Montréal.

2013 : Bourse d'excellence de la faculté des études supérieures de l'Université de Montréal.

2014 : Bourse de maternité de la faculté des études supérieures de l'Université de Montréal.

2015 : Bourse de fin d'études doctorales de la faculté des études supérieures de l'Université de Montréal.

2015 : Prix de vulgarisation de la Fédération des associations étudiantes du campus de l'Université de Montréal.

## **Annexe 2 : Les Méthodes Physiques du Transfert de Gène**

Tableau récapitulatif des différentes méthodes physiques utilisées pour le transfert de gène, leurs avantages, inconvénients et champs d'application. Ces données ont été extraites principalement de *Sophie Mehier-Humbert et Richard Guy, Physical methods for gene transfer: Improving the kinetics of gene delivery into cells, Adv. Drug Del. Review, 57 (2005) 733-753.*

Méthodes physiques	Principe	Avantages	Inconvénients	Applications
<b>Microinjection</b>	Introduction directe du gène dans le cytoplasme ou le noyau de la cellule	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Conceptuellement simple</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Approche « unique » (une cellule à la fois)</li> <li>• Appareils de précision</li> <li>• Mise au point difficile</li> <li>• Long et fastidieux</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Animaux transgéniques (modèles animaux)</li> </ul>
<b>Bombardement de particules (« pistolet à gènes »)</b>	Projection à grande vitesse de microbilles de métal enrobées d'ADN. Méthode dite biolistique (= biologique + balistique)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Applicable <i>in vitro</i></li> <li>• Applicable <i>in vivo</i> (tissus accessibles comme la peau)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Efficacité dépend de nombreux paramètres</li> <li>• Délivrance non ciblée, localisée au site de bombardement</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transformation des cellules végétales</li> <li>• Immunisation par ADN</li> </ul>
<b>Électroporation</b>	Introduction directe du gène suite à la perturbation de la membrane cellulaire par un champ électrique	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Efficace</li> <li>• Large champ d'applications <i>in vivo</i> / <i>in vitro</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mécanisme de perméabilisation mal connu</li> <li>• Nombre de copie du gène introduit inconnu</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transfert <i>in vivo</i></li> <li>• Production de r-protéines à petite et grande échelle</li> </ul>
<b>Sonoporation</b>	Application d'ultrasons augmentant la perméabilité membranaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Large champ d'applications <i>in vivo</i> / <i>in vitro</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hautes fréquences</li> <li>• Agents de contraste</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Thérapie génique</li> </ul>
<b>Irradiation par laser</b>	Source de laser dirigée sur une cellule cible <i>via</i> une lentille augmentant la perméabilité membranaire suite à un effet thermique local	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Efficace (dépendant de la différence de pression osmotique entre le milieu et cytoplasme des cellules)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peu utilisée</li> <li>• Coût</li> <li>• Taille de la source de laser</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Thérapie génique</li> </ul>
<b>Magnétofection</b>	Introduction du gène lié à des nanoparticules magnétiques parallèlement à un vecteur (d'origine virale ou non) utilisant un champ magnétique	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Haute efficacité</li> <li>• Aide à la procédure classique de transfection par les vecteurs viraux ou non-viraux</li> <li>• Applicable aux ARNi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Préparation des nanoparticules magnétiques (enrobage)</li> <li>• Perturbation des fonctions cellulaires</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transfection des cellules primaires</li> <li>• Thérapie anti-cancer</li> </ul>



## Annexe 3 : Les Vecteurs Viraux et le Transfert de Gène

Vecteurs	Avantages	Inconvénients *
<b>Rétrovirus</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Intégration du gène</li> <li>• Peu immunogène</li> <li>• Adapté pour le transfert de grands gènes (jusqu'à 8 Kpb)</li> <li>• Tropisme cellulaire étendu</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transduction des cellules en division seulement</li> <li>• Risque de mutagenèse insertionnelle</li> <li>• Faible stabilité</li> </ul>
<b>Adénovirus</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Expression du transgène élevée</li> <li>• Transduction des cellules en division ou non</li> <li>• Adapté pour le transfert de grands gènes (jusqu'à 8 Kpb)</li> <li>• Titres élevés (<math>10^{11}</math> virus / mL)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Expression transitoire du transgène</li> <li>• Très immunogène</li> </ul>
<b>Virus adéno-associés</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tropisme cellulaire étendu</li> <li>• Peu immunogène</li> <li>• Titre important (<math>10^{12}</math> virus / mL)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Limité à de petits gènes (&lt; 5 Kpb)</li> <li>• Intégration peu efficace</li> <li>• Co-transduction nécessaire</li> </ul>
<b>Lentivirus</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Transduction des cellules en division ou non</li> <li>• Peu immunogène</li> <li>• Intégration du gène</li> <li>• Adapté pour le transfert de grands gènes (jusqu'à 9 Kpb)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Titres faibles (<math>10^8</math> virus / mL)</li> <li>• Risque de mutagenèse insertionnelle</li> </ul>
<b>Virus Herpès simplex</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tropisme cellulaire étendu</li> <li>• Adapté pour le transfert de grands gènes (jusqu'à 50 Kpb)</li> <li>• Titres élevés (<math>10^{12}</math> virus / mL)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pas d'intégration</li> <li>• Risque de recombinaison</li> <li>• Très immunogène</li> </ul>
<b>Poxvirus</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adapté pour le transfert de grands gènes (jusqu'à 30 Kpb)</li> <li>• Intégration multiple du gène</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Très immunogène</li> </ul>

Tableau récapitulatif des différents vecteurs viraux utilisés pour le transfert de gène, leurs avantages et inconvénients. Ces données ont été extraites de la revue *Laura Vannucci et al., Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology, New Microbiologica, 36 (2013) 1-22*. \* Inconvénients communs à tous les vecteurs viraux : nécessitent un niveau de confinement 2, titration et conservation du stock difficile.

## Annexe 4 : Liste des Ligands Extracellulaires du SDC1

### A. Matrix proteins:

- Laminins
- Fibronectins
- Thrombospondin
- Collagen
- Fibrin
- HB-GAM
- Tenascin
- Vitronectin
- Fibrillin
- Tropoelastin

### B. Proteases

- MMP7
- MMP9
- ADAMTS4
- MT1-MMP
- Neutrophil elastase
- Cathepsin G
- Carboxypeptidase

### C. Receptors:

- Integrins
- $\alpha_v\beta_3$
- $\alpha_v\beta_5$
- $\alpha_6\beta_4$
- $\alpha_2\beta_1$
- $\alpha_3\beta_1$
- $\alpha_M\beta_2$

### Others:

- ephB4
- IGF1R
- FGFR
- ErbB2
- CD148
- Selectins (E, L, P)
- N-CAM
- P-CAM

### C. Cytokines and growth factors:

#### 1. Morphogens

- Activin
- BMP-2, BMP-4
- Chordin
- Sonic Hedgehog
- Frizzled related proteins
- Sprouty peptides
- Wnts (1–13)

#### 2. Antiangiogenic factors

- Angiostatin
- Endostatin

#### 3. Growth factors:

- Amphiregulin
- betacellulin
- HB-EGF
- neuregulin
- FGFs (1–23)
- PDGF
- GDNF
- VEGFs
- HGF
- TGF $\beta$ 1 and TGF $\beta$ 2
- TPA
- PAI-1

#### 4. Cytokines

GM-CSF  
IL-2, -3, -4, 5, -6, -7, -12  
Interferon  
TNF- $\alpha$   
CC chemokines  
CXC chemokines

### E. Energy balance Activin

- ApoB
- Apo E
- Lipoprotein lipase

### F. Complement proteins / coagulation proteines

Antithrombin II  
Tissue factor  
Pathway inhibitor  
Factors IX, X, XI, XII

### 3. Viral and parasite coat proteins

- HIV-1-tat
- HIV-1 gp41, 120
- HSV gB, gC, gD
- HHV-6, -8

Mary Ann Stepp et al., *Syndecan-1 and Its Expanding List of Contacts.*, *Adv. Wound Care.* 4 (2015) 235–249.

## Annexe 5 : Listes des Constructions Plasmidiques

- Constructions plasmidiques pour l'expression transitoire des HSPG :

Plasmides	Insert		Vecteur	Sites d'insertion
	Séquence	Origine		
pTT40-mRFP1-hGPC1	2xTetO	pYD10	pYD12-mRFP1-hGPC1	BlpI – SpeI
pTT40-mRFP1-hGPC2	2xTetO	pYD10	pYD12-mRFP1-hGPC2	BlpI – SpeI
pTT40-mRFP1-hGPC3	2xTetO	pYD10	pYD12-mRFP1-hGPC3	BlpI – SpeI
pTT40-mRFP1-hGPC5	hGPC5	pYD12-mRFP1-hGPC5	pTT40-mRFP1-H8G	EcoRI – BamHI
pTT40-mRFP1-hGPC6	hGPC6	pYD12-mRFP1-hGPC5	pTT40-mRFP1-H8G	NotI
pTT40-hSDC1-mRFP1	hSDC1	pYD12-mRFP1-hGPC5	pTT40-mRFP1-H8G	BamHI
pTT40-hSDC2-mRFP1	hSDC2	pYD12-mRFP1-hGPC5	pTT40-mRFP1-H8G	BamHI
pTT40-hSDC3-mRFP1	hSDC3	pTT5-hSDC3-GFP-H8G	pTT40-mRFP1-H8G	NheI – EcoRI
pTT40-hSDC4-mRFP1	hSDC4	pTT5-hSDC4-GFP-H8G	pTT40-mRFP1-H8G	NheI – EcoRI
pTT40-hCD4-mRFP1	hCD4	pTT5-hCD4-mRFP1	pTT40-mRFP1-H8G	NheI – EcoRI

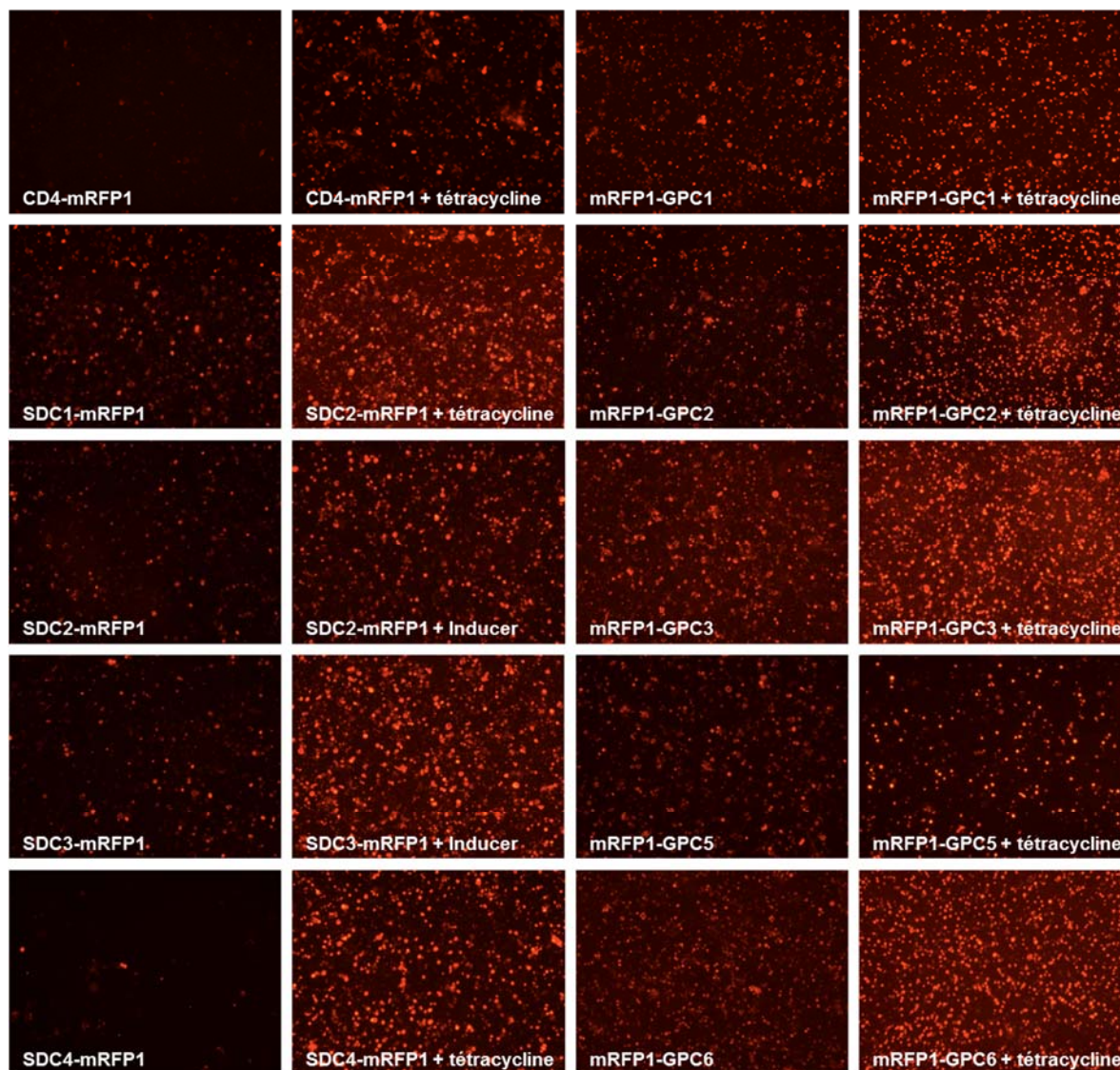
- Constructions plasmidiques pour la production des ectodomaines :

Plasmides	Insert			Vecteur	Sites d'insertion
	Séquence	Origine	Amorces		
pTT40-mRFP1-hGPC1ecto-H8G	hGPC1ecto	pTT40-mRFP1-hGPC1	OLD6*OLD7	pTT75	BamHI
pTT40-mRFP1-hGPC2ecto-H8G	hGPC2ecto	pTT40-mRFP1-hGPC2	OLD8*OLD9	pTT75	AgeI - BamHI
pTT40-mRFP1-hGPC3ecto-H8G	hGPC3ecto	pTT40-mRFP1-hGPC3	OLD8*OLD10	pTT75	AgeI - BamHI
pTT40-mRFP1-hGPC5ecto-H8G	hGPC5ecto	pTT40-mRFP1-hGPC5	OLD8*OLD11	pTT75	AgeI - BamHI
pTT40-mRFP1-hGPC6ecto-H8G	hGPC6ecto	pTT40-mRFP1-hGPC6	OLD8*OLD12	pTT75	AgeI - BamHI
pTT40-hSDC1ecto-mRFP1-H8G	hSDC1ecto	pTT40-hSDC1-mRFP1	OLD4*OG291	pTT75	BamHI
pTT40-hSDC2ecto-mRFP1-H8G	hSDC2ecto	pTT40-hSDC2-mRFP1	OLD16*OG291	pTT75	BamHI
pTT40-hSDC3ecto-mRFP1-H8G	hSDC3ecto	pTT40-hSDC3-mRFP1	OG288*OG291	pTT75	AgeI - BamHI
pTT40-hSDC4ecto-mRFP1-H8G	hSDC4ecto	pTT40-hSDC4-mRFP1	OG286*OG291	pTT75	BamHI
pTT40-hCD4ecto-mRFP1-H8G	hCD4ecto	pTT40-hCD4-mRFP1	OG287*OLD291	pTT75	AgeI - BamHI

- Constructions plasmidiques pour l'expression stable des HSPG :

Plasmides	Insert		Vecteur	Sites d'insertion
	Séquence	Origine		
pTT75-mRFP1-hGPC1	mRFP1-hGPC1	pTT40-mRFP1-hGPC1	pTT75	PmeI - EcoRI
pTT75-mRFP1-hGPC2	mRFP1-hGPC2	pTT40-mRFP1-hGPC2	pTT75	PmeI - EcoRI
pTT75-mRFP1-hGPC3	mRFP1-hGPC3	pTT40-mRFP1-hGPC3	pTT75	PmeI - EcoRI
pTT75-mRFP1-hGPC5	mRFP1-hGPC5	pTT40-mRFP1-hGPC5	pTT75	PmeI - EcoRI
pTT75-mRFP1-hGPC6	mRFP1-hGPC6	pTT40-mRFP1-hGPC6	pTT75	PmeI - NaeI/EcoRV
pTT75-hSDC1-mRFP1	hSDC1-mRFP1	pTT40-hSDC1-mRFP1	pTT75	BamHI – PmeI
pTT75-hSDC2-mRFP1	hSDC2-mRFP1	pTT40-hSDC2-mRFP1	pTT75	EcoRI – SgrAI
pTT75-hSDC3-mRFP1	hSDC3-mRFP1	pTT40-hSDC3-mRFP1	pTT75	EcoRI - BamHI
pTT75-hSDC4-mRFP1	hSDC4-mRFP1	pTT40-hSDC4-mRFP1	pTT75	EcoRI - BamHI
pTT75-hCD4-mRFP1	hCD4-mRFP1	pTT40-hCD4-mRFP1	pTT75	EcoRI - BamHI

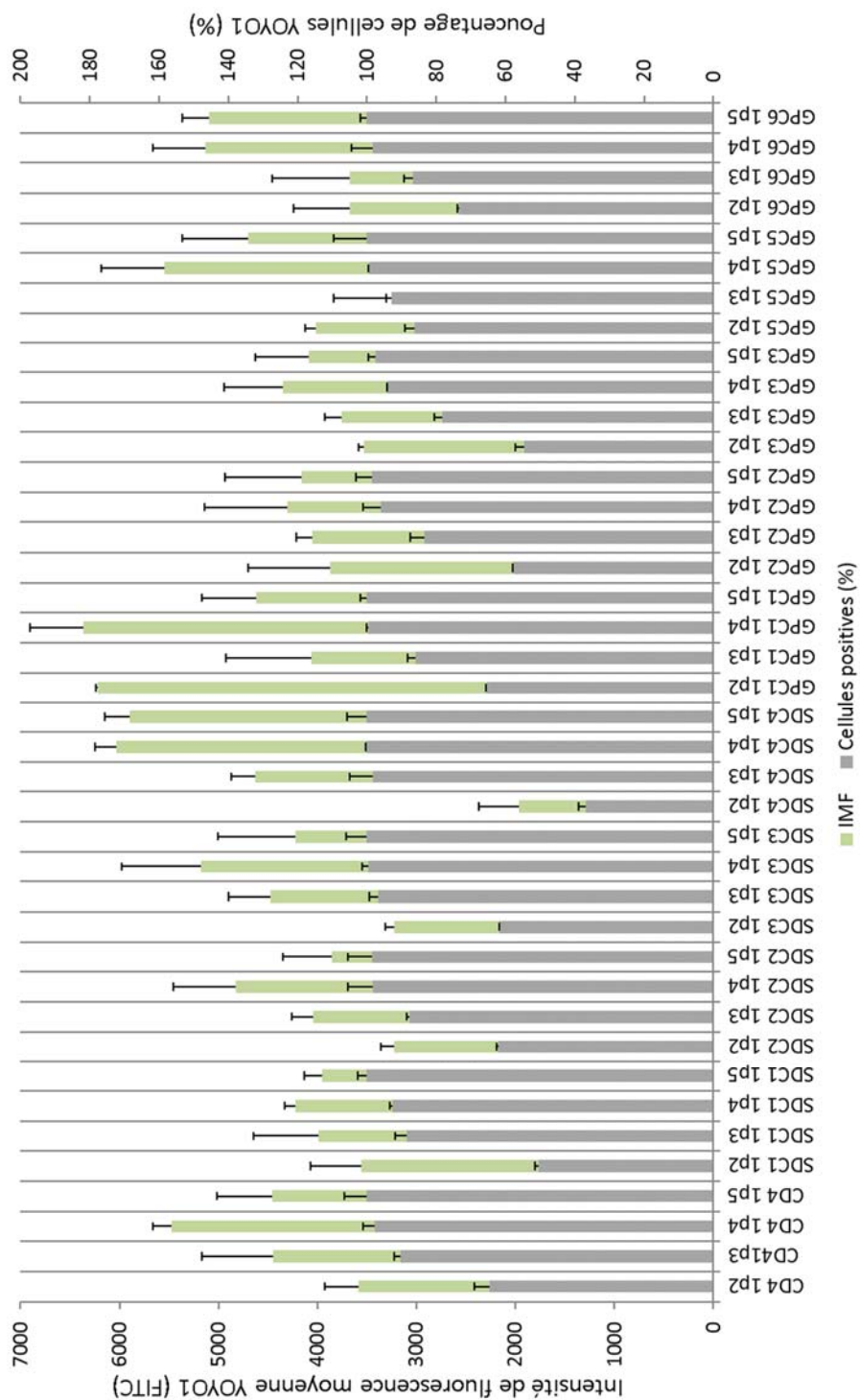
## Annexe 6 : Induction de l'Expression Transitoire des Protéoglycanes à Héparane Sulfate



Appréciation qualitative de l'expression transitoire des protéines de fusion HSPG-mRFP1 avant et après induction à la tétracycline.

Grossissement 10X. Temps d'exposition : 3 ms. Echelle : 300  $\mu\text{m}^2$ .

## Annexe 7 : Effet de l'Expression Stable des HSPG sur la Capture des Polyplexes par les Cellules CHO<sup>BRI</sup>-55E1.



## Annexe 8 : Effet de l'Expression Stable des HSPG sur l'Expression du Transgène dans les Cellules CHO<sup>BRI</sup>-55E1.

